

UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

MEMOIRE PRESENTE A  
UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAITRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR  
JOHANNE BARIBEAU

ASPECT BIOCHIMIQUE ET PHOTOCHEMIE DE LA  
CONVERSION D'ENERGIE PAR LA BACTERIORHODOPSINE

AOUT 1984

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

## RESUME

La solubilisation de la membrane pourpre de *Halobacterium halobium* par le lauryl sucrose dénature moins la bacteriorhodopsine que le traitement par d'autres détergents. Bien qu'il nous ait été impossible de délipider complètement le pigment par chromatographie dans ce détergent, le lauryl sucrose s'est avéré un agent stabilisant très efficace pour la bactériorhodopsine monomère préalablement délipidée par traitement au Triton X-100. La protéine ainsi purifiée présente un équilibre acido-basique entre deux formes spectrales différentes ayant leur maximum d'absorbance à 540 et 480 nm, respectivement. Le pKa de l'équilibre est de 6,8. La considération de cette valeur, de l'amplitude du déplacement spectral et du fait que, sous illumination, les deux formes de bactériorhodopsine donnent des batho-intermédiaires différents mais un même méta-intermédiaire, suggère que l'équilibre acido-basique correspond à celui de la base de Schiff du rétinale. Comme cet équilibre n'est observable que dans la bactériorhodopsine complètement délipidée, nous proposons que dans la membrane native, une interaction lipide-protéine spécifique prévient ce phénomène et contribue au maintien de l'intégrité structurelle et fonctionnelle de la bactériorhodopsine.

REMERCIEMENTS

A tous ceux et celles qui ont pu faciliter mon travail, aux membres du centre de recherche qui ont su apporter des critiques pertinentes, sincères remerciements.

Je voudrais exprimer toute ma reconnaissance au docteur François Boucher qui m'a donné l'encouragement et la motivation nécessaires pour entreprendre et poursuivre cette recherche.

Je remercie également Mme Paulette Fejer (Département de Biochimie, Université d'Ottawa) pour l'enseignement de la technique de préparation de la membrane pourpre.

Enfin, je remercie le CRSNG pour le support financier qu'il m'a accordé au long de mes études.

## TABLE DES MATIERES

	Page
RESUME .....	ii
REMERCIEMENTS .....	iii
LISTE DES FIGURES .....	viii
LISTE DES ABREVIATIONS .....	x
CHAPITRE I	
INTRODUCTION	
1.1 Piège à énergie .....	1
1.2 Les bactéries halophiles extrêmes .....	2
1.3 Le pigment photochimique: la bactériorhodopsine .....	3
1.4 Photochimie de la bactériorhodopsine .....	5
1.5 Biochimie de la membrane pourpre .....	9
1.5.1 Structure de la membrane pourpre .....	9
1.5.2 Organisation membranaire de la bactériorhodopsine .....	10
1.5.3 Les lipides membranaires des bactéries halophiles .....	10
1.5.4 Monomérisation de la bactériorhodopsine .....	12
1.6 Protéines photoréceptrices: comparaison entre la bactériorhodopsine et la rhodopsine animale .....	16
1.7 But du travail .....	17
CHAPITRE II	
MATERIEL ET METHODES EXPERIMENTALES	
2.1 Culture et récolte des bactéries .....	19

	Page
2.1.1 Souches bactériennes .....	19
2.1.2 Milieu de culture .....	19
2.1.3 Pré-inoculation .....	20
2.1.4 Inoculation .....	21
2.1.5 Induction de la membrane pourpre .....	21
2.1.6 Récolte des bactéries .....	22
2.1.7 Conservation des souches bactériennes .....	23
2.2 Préparation de la membrane pourpre .....	24
2.2.1 Séparation de la membrane pourpre des débris cellulaires .....	24
2.2.2 Purification de la membrane pourpre .....	25
2.3 Purification de la bactériorhodopsine de la membrane pourpre .....	25
2.3.1 Solubilisation de la membrane pourpre et stabilité de la bactériorhodopsine dans les détergents .....	25
2.3.1.1 Préparation des échantillons .....	26
2.3.1.2 Méthode expérimentale .....	26
2.3.2 Séparation des lipides de la protéine .....	27
2.3.2.1 Principe de la méthode .....	27
2.3.2.2 Méthode expérimentale .....	28
2.3.2.3 Etude de la bactériorhodopsine purifiée par chromatographie sur couche mince .....	29
2.3.3 Délipidation de la bactériorhodopsine (deuxième méthode) .....	30
2.4 Techniques spectroscopiques .....	31
2.4.1 Absorption .....	31

	Page
2.4.2 Accessoires de basse température .....	32
2.4.2.1 Méthode expérimentale .....	32
2.4.3 Dichroïsme circulaire .....	33
2.5 Effet du pH sur la bactériorhodopsine purifiée .....	34
2.6 Effet de l'hydroxylamine et du borohydrure de sodium .....	34
2.6.1 Principe .....	34
2.6.2 Méthode expérimentale .....	35
2.7 Produits chimiques .....	35
CHAPITRE III	
RESULTATS ET DISCUSSION	
3.1 Préparation de la membrane pourpre .....	37
3.1.1 Conditions de culture .....	37
3.1.2 Rendement de membranes pourpres .....	37
3.1.3 Analyse spectrale de la membrane pourpre .....	38
3.2 Solubilisation de la membrane pourpre .....	38
3.2.1 Stabilité de la bactériorhodopsine dans les détergents .....	40
3.2.2 Etat d'agrégation de la bactériorhodopsine dans les détergents .....	45
3.2.3 Etat fonctionnel de la bactériorhodopsine solubilisée .....	46
3.2.4 Discussion .....	48
3.3 Délipidation de la bactériorhodopsine .....	52
3.3.1 Chromatographie par interaction hydrophobe .....	52
3.3.2 Analyse des fractions par chromatographie sur couche mince .....	56

	Page
3.3.3 Délipidation par la méthode de Huang et coll. ....	58
3.3.4 Echange de détergent .....	59
3.3.5 Résultats de la délipidation .....	59
3.3.6 Discussion .....	60
3.4 Propriétés spectroscopiques de la bactério- rhodopsine délipidée .....	62
3.4.1 Effet du pH .....	62
3.4.2 Effet de l'hydroxylamine et du borohydrure de sodium .....	66
3.4.3 Discussion .....	67
3.5 Caractérisation des intermédiaires du photocycle de la bactériorhodopsine purifiée .....	76
3.5.1 Comparaison des méta-produits de la membrane pourpre, de la bactériorhodopsine solubilisée et de la bactériorhodopsine délipidée .....	76
3.5.2 Formation des batho-intermédiaires .....	80
3.5.3 Discussion .....	82
3.6 Discussion générale .....	84
BIBLIOGRAPHIE .....	88



## LISTE DES FIGURES

	Page
1. Formation de la base de Schiff entre le rétinol et la bactériorhodopsine .....	4
2. Modèle du photocycle de la bactériorhodopsine dans la membrane pourpre .....	7
3. Séquence des acides aminés et structure de la bactériorhodopsine dans la membrane pourpre .....	11
4. Structures des lipides polaires principaux .....	13
5. Structure du lauryl sucrose (L-1690) .....	15
6. Spectre d'absorption de la membrane pourpre adaptée à l'obscurité .....	39
7. Changements spectraux lors de la solubilisation des membranes pourpres dans l'Emulphogène BC-720 .....	42
8. Dénaturation de la bactériorhodopsine dans différents détergents .....	43
9. Spectres de dichroïsme circulaire de la bactériorhodopsine native et solubilisée dans le lauryl sucrose .....	47
10. Adaptation à la lumière de la bactériorhodopsine solubilisée dans le lauryl sucrose .....	49
11. Profil d'élution de la bactériorhodopsine lors de la chromatographie hydrophobe .....	53
12. Spectres d'absorption des fractions obtenues lors de la chromatographie hydrophobe .....	55
13. Chromatogramme résultant de la séparation lipidique de différents échantillons .....	57
14. Spectre d'absorption de la bactériorhodopsine délipidée à pH 6 .....	61
15. Effet du pH sur le spectre de la bactériorhodopsine purifiée .....	64

	Page
16. Variation du $\lambda_{\text{max}}$ et courbe de titration de la bactériorhodopsine purifiée en fonction du pH .....	65
17. Effet de l'alcalinisation de la bactériorhodopsine solubilisée par comparaison à la membrane pourpre native .....	71
18. Modèle de charge ponctuelle externe pour la bactériorhodopsine .....	74
19. Formation du méta-intermédiaire de la membrane pourpre solubilisée .....	77
20. Formation du méta-intermédiaire de la bactériorhodopsine purifiée .....	79
21. Formation des batho-intermédiaires de la bactériorhodopsine purifiée .....	81
22. Schéma de la photochimie de la bactériorhodopsine purifiée .....	83

## LISTE DES ABREVIATIONS

MR	Membrane rouge
MP	Membrane pourpre
bR	Bactériorhodopsine
AL	Adaptée à la lumière
AO	Adaptée à l'obscurité
DC	Dichroïsme circulaire
CCM	Chromatographie sur couche mince
DOC	Deoxycholate

## CHAPITRE I

### INTRODUCTION

#### 1.1 Piège à énergie

La photosynthèse est une des fonctions biologiques les plus fondamentales. Elle consiste en l'emmagasinement de l'énergie lumineuse solaire sous forme d'énergie chimique. A l'échelle de la planète, ce stockage d'énergie équivaut à environ  $10^{13}$  kilocalories par année (Rabinovitch et Govindjee 1969), soit une puissance de près de  $2 \times 10^{12}$  watts.

Cette capacité d'utiliser l'énergie lumineuse solaire est le privilège des organismes photosynthétiques. Ces derniers possèdent des structures capables de piéger l'énergie lumineuse. Parmi ces systèmes photosynthétiques, on retrouve certaines souches de bactéries halophiles qui, contrairement aux organismes photosynthétiques chlorophylliens, utilisent la vitamine A comme pigment photosynthétique. Ce pigment est situé dans une partie spécialisée de la membrane cellulaire des halobactéries. L'absorption d'un photon par ce groupement prosthétique déclenche un cycle réactionnel au cours duquel il y a pompage de protons au travers de la membrane. *In vivo*, le gradient électrochimique créé sert à la synthèse d'ATP; *in vitro*, ce processus pourrait être utilisé pour convertir l'énergie solaire en une différence de potentiel électrique (Sportelli et Martino 1982).

## 1.2 Les bactéries halophiles extrêmes

Les bactéries halophiles extrêmes sont des microorganismes dont le maximum de croissance est atteint à des concentrations de NaCl entre 20 et 30% (Larsen 1962 et 1967, Kushner 1968). Ce sont des organismes de pigmentation rouge (caroténoïdes) qui s'étendent largement dans les eaux naturelles très salines comme la Mer Morte et aussi dans les endroits où le sel est obtenu par l'évaporation solaire de l'eau de mer. Ainsi, leur habitat naturel est d'intense soleil et de concentration basse en oxygène (Bayley et Morton 1978).

Les espèces principales de bactéries halophiles sont regroupées en deux genres: *Halobacterium* et *Halococcus* dans la famille des *Halobacteriaceae* (Gibbons 1974). Ce sont les *Halobacterium* que ont fait l'objet d'études plus poussées parce qu'elles sont particulièrement sensibles aux basses concentrations de sel dans lesquelles elles se lysent (Abram et Gibbons 1960); il est donc plus facile d'en étudier les constituants cellulaires.

Un trait inhabituel de l'enveloppe des espèces appartenant au genre *Halobacterium* est l'absence d'acide diaminopimélique, d'acide muramique, de D-aminoacide et d'acide teichoïque; elles ne contiennent pas de peptidoglycan rigide normalement présent chez les bactéries non-halophiles (Brown et Shorey 1963, Kushner et al. 1964, Kushner et Onishi 1968). Néanmoins, elles possèdent une enveloppe cellulaire constituée d'une structure membranaire composée d'unités typiques avec une paroi cellulaire sur sa surface extérieure (Stoeckenius et Rowen 1967, Cho et

al. 1967). Cette enveloppe cellulaire est extrêmement sensible à la force ionique du milieu. Lorsque les cellules sont suspendues dans l'eau distillée, les enveloppes se désintègrent rapidement en fragments membranaires de grandeurs variables (Kushner et al. 1964).

Les fragments de membranes cellulaires peuvent être séparés, par centrifugation différentielle, en deux fractions principales: la membrane rouge (MR) contenant la bactériorubérine (un caroténoïde ayant 50 carbones,  $C_{50}$ ) et la membrane pourpre (MP) composée essentiellement d'une seule protéine: la bactériorhodopsine (bR) (Stoeckenius et Rowen 1967, Stoeckenius et Kunau 1968). La MR prédomine lorsque les bactéries sont cultivées en aérobiose. Par contre, dans des conditions de lumière intense et de basse concentration d'oxygène, elles développent des "pièces" de MP d'environ 0,5  $\mu m$  de diamètre (Oesterhelt et Stoeckenius 1971) dans la MR. La MP peut ainsi occuper plus de 50% de la surface de la cellule.

### 1.3 Le pigment photochimique: la bactériorhodopsine

La membrane pourpre contient seulement une protéine: la bactériorhodopsine. Celle-ci est responsable de la couleur pourpre de la membrane qui est attribuable à la liaison covalente entre le rétinol et un résidu lysine de la bactériopsine. Ce lien de base de Schiff résulte de la condensation du groupement aldéhyde du rétinol avec l'amine de la lysine (voir figure 1), (Oesterhelt et Stoeckenius 1971).

La bR est à la base du système de phosphorylation des bactéries halophiles extrêmes. Elle fonctionne comme une pompe à protons unidirec-

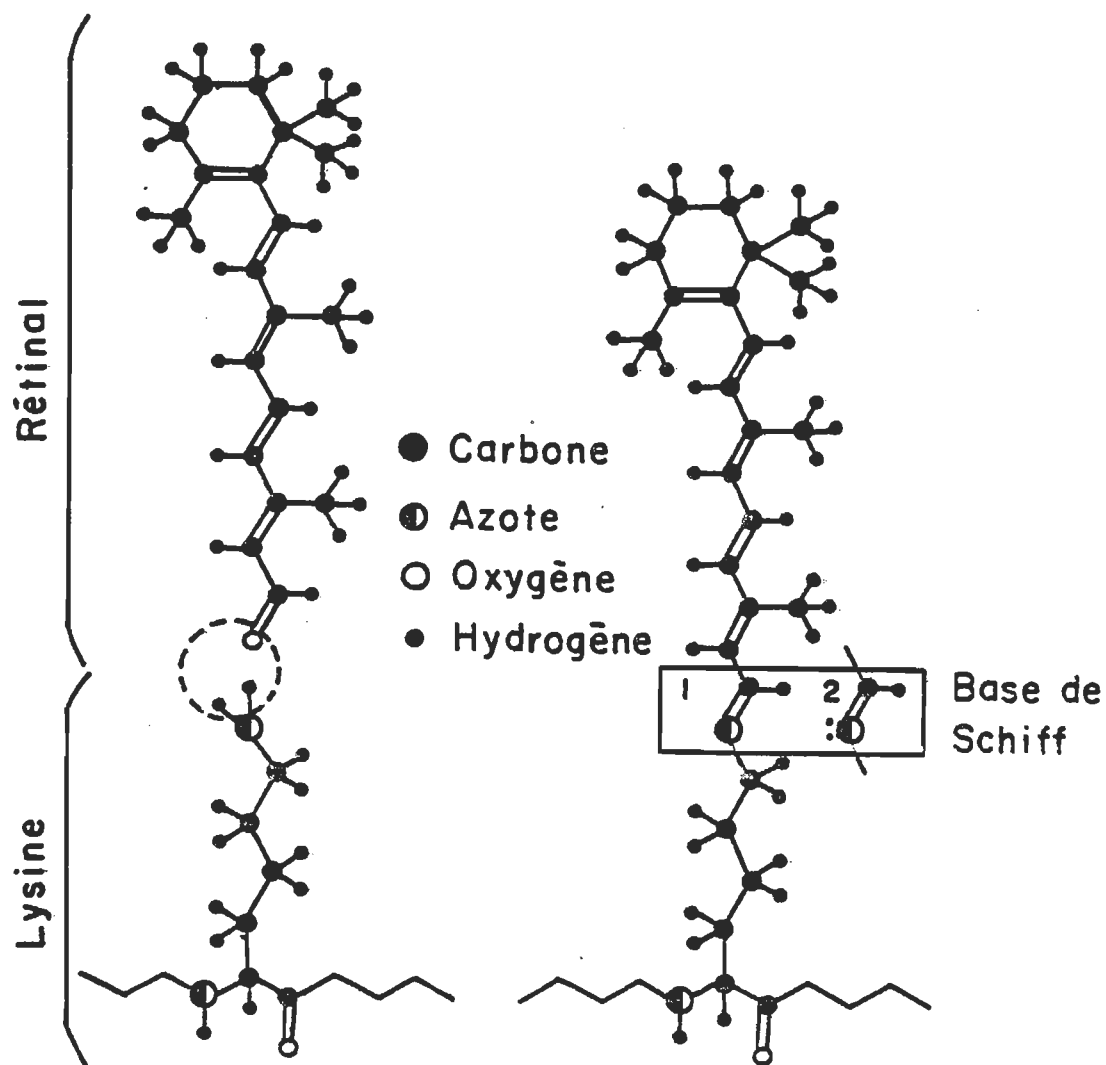


Figure 1 : Formation de la base de Schiff entre le chromophore de la bactériorhodopsine, le rétinol et un résidu lysine de la bactériorhodopsine. Lorsqu'ils se combinent, il y a élimination d'une molécule d'eau et la base de Schiff est formée entre les atomes de carbone et d'azote. La base de Schiff perd et regagne un proton dans la photoréaction, alternant entre les deux formes suivantes: protonée (1) et déprotonée (2).

tionnelle, convertissant l'énergie lumineuse en un potentiel électrochimique membranaire (Oesterhelt et Stoeckenius 1973, Danon et Stoeckenius 1974, Racker et Stoeckenius 1974). Ainsi, l'oxydation des substrats par l'oxygène de même que la photoréaction de la bR peuvent tous deux contribuer à créer un gradient électrochimique membranaire. Dans les deux cas, le retour des protons via l'ATPase membranaire est responsable de la synthèse d'ATP (Racker et Stoeckenius 1974) et fournit l'énergie nécessaire aux différents processus métaboliques se produisant dans la cellule.

Donc ces bactéries possèdent deux sources primaires d'énergie: une chaîne respiratoire et la MP. Lorsque le taux de synthèse d'ATP via la phosphorylation oxydative devient inadéquat, la MP se met en opération.

#### 1.4 Photochimie de la bactériorhodopsine

Un cycle photochimique est relié avec le transport vectoriel de protons à travers la membrane. La photoréaction de la bR constitue un cycle impliquant la photoisomérisation, l'isomérisation thermique du rétinol, la déprotonation et la reprotonation de la base de Schiff et des changements concomittants dans la conformation de la protéine. Ces différents évènements résultent en des changements du spectre d'absorption et peuvent être reconnus par plusieurs intermédiaires métastables différents tout au long des changements successifs de l'interaction rétinol-protéine (Callender 1982).

La bR existe en deux formes stables: une forme adaptée à la lumière ( $bR_{570}^{AL}$ ) avec une bande d'absorption à  $\approx 567$  nm, et une forme adaptée à



l'obscurité ( $bR_{560}^{AO}$ ) absorbant à  $\approx 559$  nm. Ces deux formes sont interconvertibles selon la réaction suivante:  $bR_{560}^{AO} \xrightleftharpoons{h\nu} bR_{570}^{AL}$ . La réaction directe demande une courte exposition à une source lumineuse intense de longueur d'onde entre 500 et 600 nm tandis que la conversion à la forme d'obscurité est une réaction lente ayant une demie-vie d'environ 20 minutes à  $35^{\circ}\text{C}$  (Oesterhelt et al. 1973). Le passage de  $bR_{560}$  à  $bR_{570}$  implique une isomérisation du 13-cis en tout-trans rétinale.  $bR_{560}^{AO}$  a un mélange équimolaire des isomères tout-trans et 13-cis (Pettei et al. 1977) à pH neutre tandis que  $bR_{570}^{AL}$  contient seulement du tout-trans rétinale (Oesterhelt et al. 1973). Donc, la lumière change le rapport molaire vers une prédominance de tout-trans rétinale et l'équilibre est retrouvé par une réaction thermique à la noirceur.

Lorsque la bR adaptée à la lumière ( $bR_{570}^{AL}$ ) absorbe un photon, elle se convertit en batho-bactériorhodopsine (batho-trans bR ou  $bK_{590}$ ) dont la bande d'absorption subit un déplacement bathochrome comparativement à celle de  $bR_{570}^{AL}$ . Il est formé très rapidement ( $10^{-12}$  secondes) et est stable seulement à basse température entre  $-190^{\circ}$  et  $-120^{\circ}\text{C}$  (Stoeckenius et Lozier 1974, Tokunaga et al. 1976). Seules la formation de ce premier intermédiaire et la transformation inverse ( $bK_{590} \rightleftharpoons bR_{570}^{AL}$ ) impliquent l'absorption d'un photon; les autres intermédiaires résultent de réactions thermiques (voir figure 2).

Lorsqu'on réchauffe le bathointermédiaire, le cycle photochimique est initié (Stoeckenius et Lozier 1974, Litvin et al. 1975), produisant

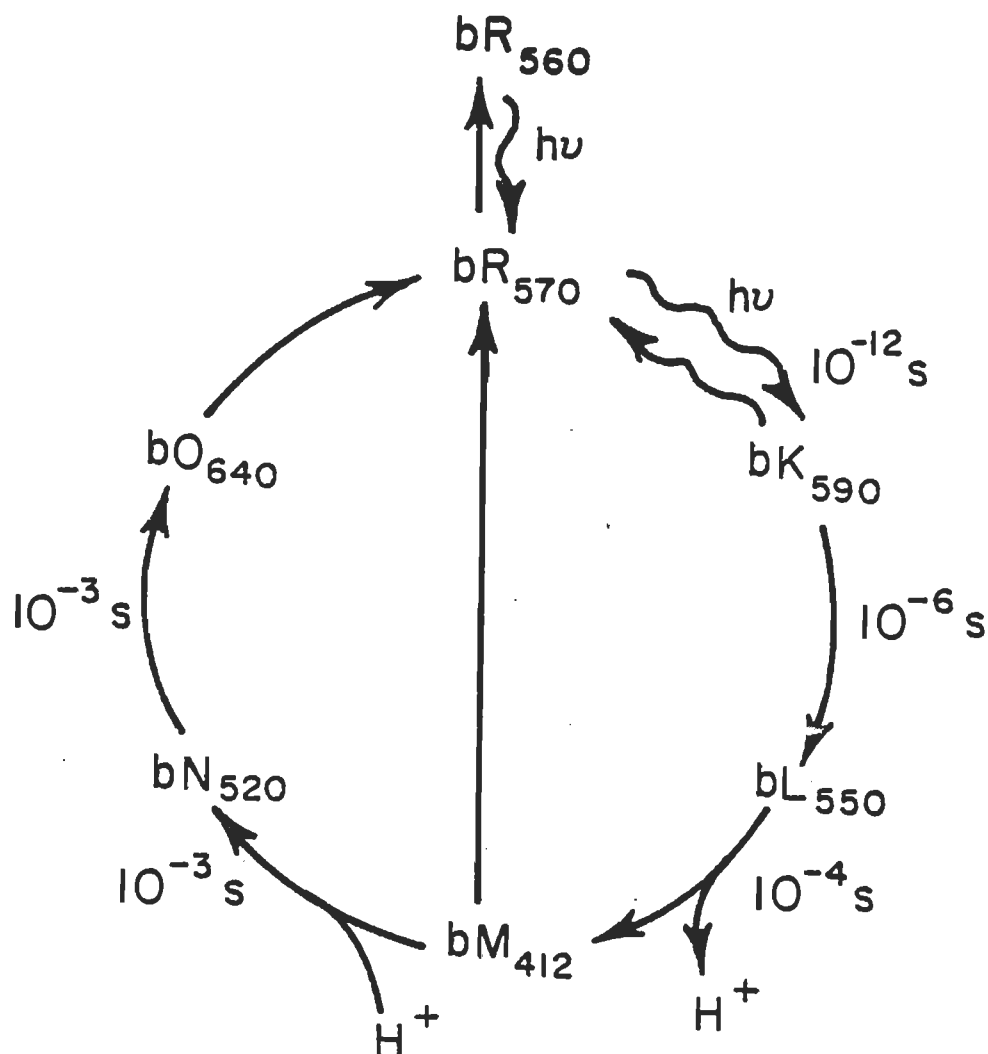


Figure 2 : Modèle du photocycle de la bactériorhodopsine dans la membrane pourpre.

~~~~~> Réaction stimulée par la lumière.

————> Réaction thermique à l'obscurité.

Les maximums d'absorption des intermédiaires sont indiqués par les nombres en indice.

Au cours de la photoréaction de la bactériorhodopsine, un proton est relâché dans le milieu et un proton est repris.

une lumi-bactériorhodopsine ( $bL_{550}$  ou  $\text{lumi-bR}^T$ ) (Iwasa et al. 1980) dans l'ordre de la microseconde, dont la stabilité thermique se situe à des températures inférieures à  $-95^\circ\text{C}$ . Si on augmente davantage la température,  $bL_{550}$  se transforme en méta-bactériorhodopsine ( $bM_{412}$  ou  $\text{méta-bR}^T$ ) en environ  $10^{-4}$  secondes et ce métaproduit est stable entre  $-90^\circ$  et  $-50^\circ\text{C}$ .

Par la spectroscopie à basse température, Iwasa n'observe pas d'autres intermédiaires dans le cheminement de  $\text{méta-bR}^T$  à  $\text{trans-bR}$  ( $bR_{570}^{AL}$ ), correspondant aux intermédiaires N et O, qui ont été détectés par photolyse éclair (Dencher et Wilms 1975). Selon Iwasa, il y a deux raisons possibles pour lesquelles les intermédiaires N et O ne sont pas détectés par spectroscopie à basse température. Premièrement, la vitesse de réaction de  $\text{méta-bR}^T$  à N qui est dans la milliseconde peut être plus lente que celle de N à O. Dans ces conditions, le temps de vie de N devient très court; il se convertit donc très rapidement au prochain intermédiaire et il devient impossible à détecter avec un spectrophotomètre conventionnel. Ceci peut être aussi vrai pour le cas de O. L'autre raison est que la réaction thermique de  $\text{méta-bR}^T$  peut avoir au moins deux voies de désactivation thermique. Ceci signifie que N et O seraient sur un chemin parallèle à celui de cycle réactionnel principal.

De plus, Iwasa et al. (1980) ont montré que  $\text{lumi-bR}^T$  est relié non seulement avec  $\text{méta-bR}^T$  mais aussi avec  $\text{trans-bR}$ . Le rapport entre  $\text{lumi-bR}^T$  à  $\text{méta-bR}^T$  ou  $\text{trans-bR}^T$  semble dépendre de la température de la réaction.

Lors de la formation photochimique de  $M_{412}$  (ou méta- $bR^T$ ), un proton est relâché dans le milieu et lors de la disparition de  $M_{412}$ , un proton est repris. Ceci suggère donc que le transport vectoriel de protons soit couplé à une réaction de protonation-déprotonation de la base de Schiff (Lewis et al. 1974), l'intermédiaire  $M_{412}$  correspondant à la forme déprotonée.

Le temps du photocycle entier est de 10 milli-secondes à une température d'environ 35°C. Le cycle de photoréaction de bR peut être affecté par les solvants, par le pH et par la concentration de sel (Dencher et Wilms 1975); conséquemment la géométrie du chromophore peut être changée.

## 1.5 Biochimie de la membrane pourpre

### 1.5.1 Structure de la membrane pourpre

La membrane pourpre a une épaisseur de 48 Å. Elle a une structure en réseau cristallin conférée par un arrangement ordonné de trimères de bR en disposition hexagonale (Unwin et Henderson 1975) dans le plan de la membrane. Ceci donne à la MP une structure extrêmement rigide et immobilise presque entièrement les lipides. On croit que cette structure cristalline contribue en quelque sorte à maintenir l'intégrité de la protéine (Ebrey et al. 1977, Peters et Peters 1978). De plus, des analyses par diffraction des rayons X et par microscopie électronique suggèrent que les protéines et

les lipides soient distribués asymétriquement à travers la MP (Blaurock et King 1977).

#### 1.5.2 Organisation membranaire de la bactériorhodopsine

Le monomère de bR est une protéine globulaire compacte de 26 000 daltons dont la structure est formée par la juxtaposition de 7 hélices  $\alpha$ , ayant chacune 35 à 40 Å de long, perpendiculaires au plan de la membrane et qui s'étendent sur la presque totalité de la bicouche (voir figure 3).

La chaîne polypeptidique de la bR est constituée de 248 acides aminés (Khorana et al. 1979, Ovchinnikov et al. 1979), ne contient pas d'histidine ni de cystéine et 70% de ses acides aminés sont hydrophobes. Le côté N-terminal est exposé à la surface extracellulaire et le côté C-terminal est à la surface cytoplasmique (Wallace 1982). La position du chromophore dans la membrane semble être à environ 10 Å de la face cytoplasmique (Thomas et Stryer 1980) où le rétinol est lié à la lysine 216 de la bactériopsine. (Stoeckenius 1980).

#### 1.5.3. Les lipides membranaires des bactéries halophiles

Les lipides membranaires remplissent les espaces entre les molécules de protéines (Stoeckenius 1980). En plus des phospholipides qui constituent la majeure partie des lipides membranaires, les halobactéries contiennent un sulfate d'un glycolipide (inhabituel dans la nature) ne se retrouvant que dans la membrane pourpre.

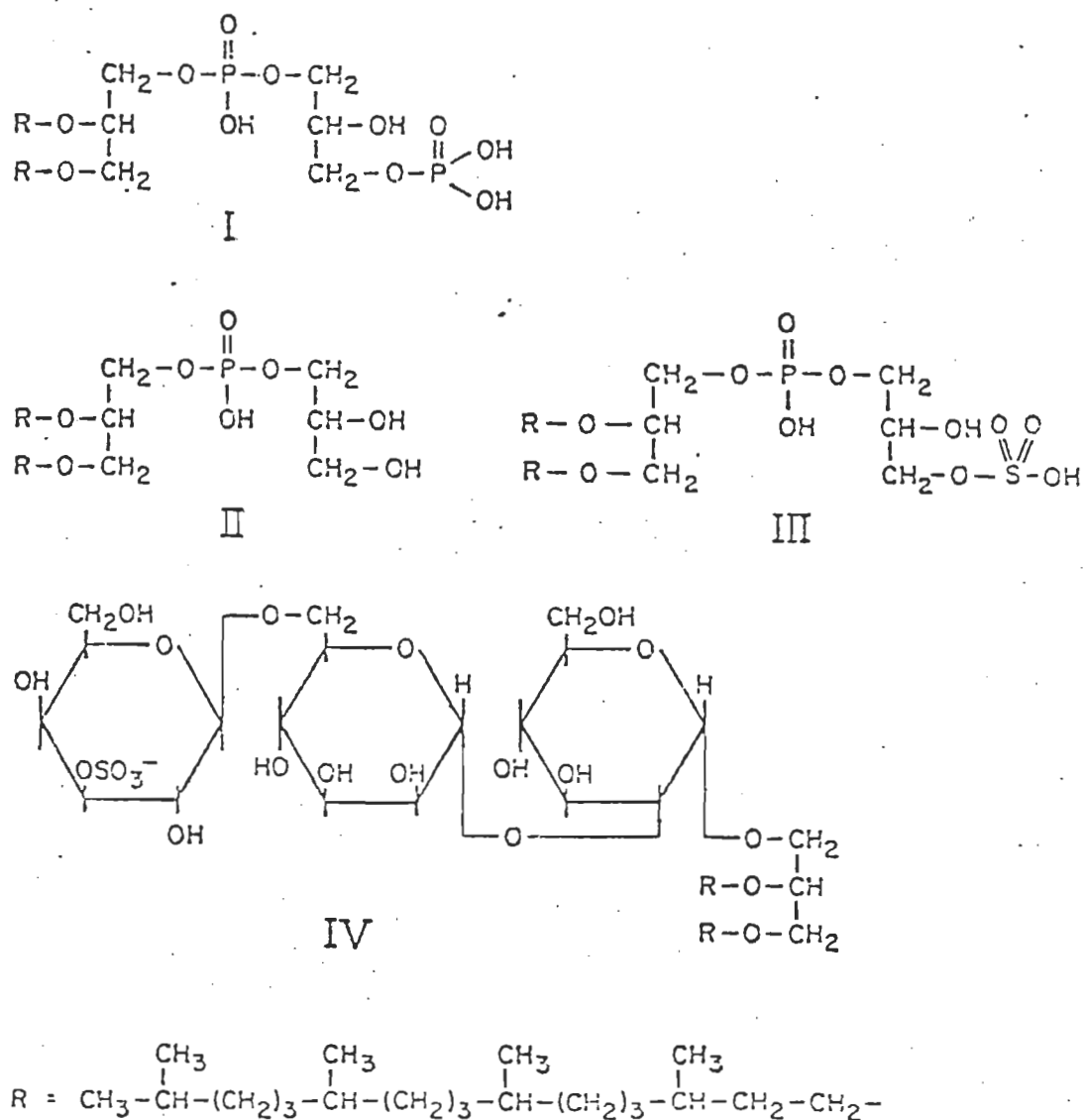


Kates (1972) et, Kates et Kushwaha (1976) ont démontré que les lipides polaires constituent environ 90% des lipides totaux. Une propriété inhabituelle de la membrane cellulaire est qu'ils sont tous dérivés d'un diether de glycérol dans lequel les chaînes hydrocarbonnées sont des groupements phytanyl: 2,3 - di-O-phytanyl-sn-glycérol, tandis qu'on retrouve communément au point de vue biologique des esters d'acide gras et de glycérol (Kates 1972). Le groupement phytanyl est une chaîne saturée composée de quatre unités isoprènes. Les phospholipides majeurs (voir figure 4) sont des analogues du diphytanyl glycerol ether de phosphatidyl glycérophosphate (I), phosphatidyl glycérol (II) et phosphatidyl glycérosulfate (III), ce dernier n'étant pas présent dans la MR.

Les lipides neutres sont constitués principalement de squalènes, dihydro et tétrahydrosqualène, vitamine MK-8, diphytanyl glycerol éther et de pigments variés. Ces derniers sont caractéristiques des halophiles extrêmes (Kushwaha et al. 1974) où l'on retrouve les caroténoïdes contenant 50 carbones (bactériorubérine) seulement dans la MR (Kushwaha et al. 1975b) tandis que le rétinol n'est présent que dans la MP.

#### 1.5.4 Monomérisation de la bactériorhodopsine

Le réseau cristallin que constituent les trimères de bR peut être solubilisé par des traitements avec certains détergents pour obtenir de la bR sous forme de monomère.



**Figure 4 :** Structures des lipides polaires principaux d'après Kates et al. (1982).

- I Phosphatidyl glycérophosphate
- II Phosphatidyl glycérol
- III Phosphatidyl glycérosulfate
- IV Sulfate de glycolipide



Quelques détergents anioniques ont été utilisés (Padros et al. 1984), mais les meilleurs résultats ont cependant été obtenus avec les détergents non-ioniques comme le Triton X-100 (Heyn et al. 1975, Becher et Ebrey 1976, Reynolds et Stoeckenius 1977, Dencher et Heyn 1978, Casadio et al. 1980, Lam et Packer 1983) et l'octylglucoside (Dencher et Heyn 1978, Lam et Packer 1983). Ces détergents, en plus de monomériser la protéine, accélèrent le photocycle et affectent les interactions rétinale-protéine de telle sorte qu'ils induisent des changements dans les spectres d'absorption.

Récemment, Naito et al. (1981) ont utilisé le lauryl sucrose dans le but de solubiliser la MP. Ce nouveau détergent, un ester de sucrose et d'acide laurique, n'est malheureusement pas disponible en tant que produit pur; il contient principalement des monoesters mais aussi des di- et tri-esters et peut être révélé en 5 à 8 "taches" par chromatographie sur couche mince (DeGrip 1982). Cependant, ce détergent semble très doux, efficace pour disperser les membranes photoréceptrices (Nashima et al. 1978) et mime quelques propriétés des phospholipides (Nashima et al. 1980). Lorsque les MP sont solubilisées dans le lauryl sucrose, les interactions spécifiques rétinale-protéine sont maintenues, le pigment retient sa propriété d'adaptation à la lumière et il possède un photocycle apparemment intact (Naito et al. 1981).

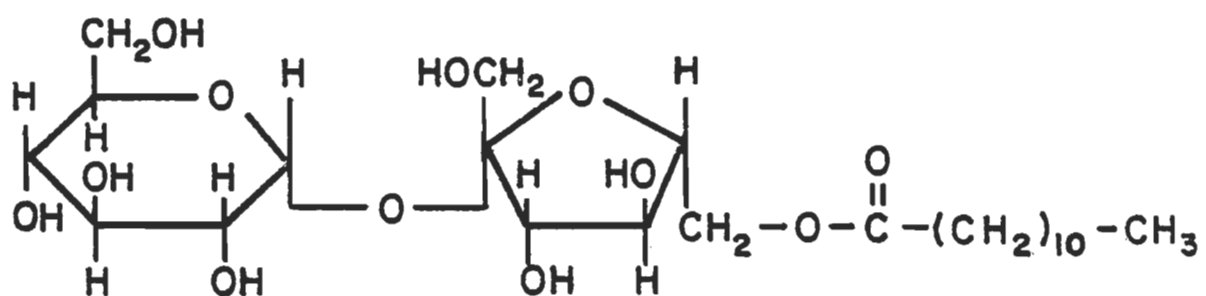


Figure 5 : Structure du lauryl sucrose (L-1690)

### 1.6 Protéines photoréceptrices: comparaison entre la bactériorhodopsine et la rhodopsine animale

La bactériorhodopsine et la rhodopsine animale sont deux protéines photosensibles spécifiques qui jouent un rôle important dans l'absorption et la transduction d'énergie lumineuse. Cependant, ces deux protéines ont différentes fonctions biologiques. Dans le processus visuel, la rhodopsine convertit l'énergie du photon absorbé en une différence de potentiel électrique de la membrane cellulaire, ce qui conduit à l'excitation visuelle. La bR, pour sa part, utilise directement l'énergie lumineuse pour transporter des protons à travers la membrane cellulaire contre leur gradient électrochimique. Le potentiel membranaire induit par la lumière est de grandeur comparable dans les deux cas soit 280 à 300 mV (Stoeckenius et Bogomolni 1982).

La bR est le seul pigment non-visuel connu qui contienne un rétinal; cependant, les isomères de ce dernier sont différents de ceux du pigment visuel: la rhodopsine. En effet, la bactériopsine forme un complexe avec soit le 13-cis ou le tout-trans rétinal tandis que l'opsine animale réagit spontanément seulement avec le 11-cis ou le 9-cis rétinal. De plus, contrairement à la rhodopsine animale, le chromophore de la bR ne se dissocie pas de la protéine lorsqu'elle est illuminée. Par contre, les deux pigments sont des bases de Schiff protonées et leur maximum d'absorption semble régularisé par des interactions électrostatiques provenant de l'opsine. Dans les deux cas, la première réaction photochimique arrive très rapidement ( $< 10^{-11}$  seconde) et produit un intermédiaire bathochrome qui est stable seulement à très basse température.

La bR et la rhodopsine possèdent une homologie de structure tridimensionnelle (Dratz et Hargrave 1983). Quoique leur séquence d'acides aminés soit différente, ces deux protéines sont constituées de sept hélices  $\alpha$  transmembranaires et les résidus lysines qui forment le lien aldimine sont situés dans le segment C-terminal intramembranaire (Ovchinnikov 1982). Dans les deux cas, on retrouve une grande quantité d'acides aminés hydrophobes et en particulier la phénylalanine. Cependant, la bR est plus petite (26 000 daltons) et phosphorylée tandis que la rhodopsine bovine (39 000 daltons) est glycosylée (Bayley et Morton 1978).

Enfin, il n'y a pas de rotation de la bR dans la MP comparable à celle de la rhodopsine dans la membrane des disques des segments externes des bâtonnets (Bayley et Morton 1978).

### 1.7 But du travail

A long terme, les travaux de notre laboratoire visent à caractériser le mécanisme moléculaire de la vision. Comme la bactériorhodopsine partage plusieurs propriétés avec la rhodopsine animale, il ne fait aucun doute que l'analyse photochimique et biochimique de la bactériorhodopsine permettra de mieux comprendre l'aspect moléculaire de la transduction énergétique par ces deux protéines.

Dans la membrane pourpre, la bactériorhodopsine est fortement associée à son environnement lipidique. Afin de préciser l'importance que peuvent avoir ces associations dans le maintien de l'activité et de l'in-

tégrité de la protéine, nous présentons ici une méthode de purification et de stabilisation de la forme monomérique de la bactériorhodopsine.

L'analyse des propriétés biochimiques et photochimiques de cette forme purifiée de bactériorhodopsine permettra de connaître l'effet de la délipidation sur la bR et de voir l'importance éventuelle des interactions lipides-protéines dans le maintien de son intégrité fonctionnelle et structurale.

## CHAPITRE II

### MATERIEL ET METHODES EXPERIMENTALES

#### 2.1 Culture et récolte des bactéries

##### 2.1.1 Souches bactériennes

La réalisation de ce travail est rendue possible grâce à l'acquisition de quatre souches bactériennes appartenant toutes à la famille des *Halobacteriaceae* plus précisément au genre *Halobacterium* (Gibbons, N.E. 1974): la souche sauvage *Halobacterium cutirubrum* donnée par le Dr Morris Kates (Université d'Ottawa) et les souches mutantes  $R_1$ ,  $R_1M_1$  et Sq de *Halobacterium halobium* provenant du Dr Walther Stoeckenius (Université de la Californie à San Francisco).

##### 2.1.2 Milieu de culture

La technique utilisée pour la préparation du milieu de culture ainsi que pour la culture même des bactéries est celle de Kushwaha et coll. (1975a). La culture de ces bactéries nécessite un milieu de composition un peu particulière. Pour obtenir 1 litre de ce milieu, les produits suivants sont dissous dans de l'eau distillée par ordre d'apparition:

- 1) NaCl 250 g
- 2) KCl 2 g
- 3)  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  3 g
- 4)  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  20 g
- 5) 1 ml d'une solution contenant 0,5 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , dans 10 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  qu'on acidifie avec 3 gouttes de HCl 1N. Le pH de la solution est ajusté à pH 6.5-6.7 et cette solution de sel est stérilisée par autoclavage.
- 6) Oxoid peptone (bacteriological peptone) 10 g. Les peptones sont ajoutées après la stérilisation.

### 2.1.3 Pré-inoculation

La première étape de croissance bactérienne s'effectue de la manière suivante:

- a) Deux boucles pleines de bactéries provenant de la souche de départ (gélose ensemencée) sont inoculées dans 100 ml de milieu de culture contenu dans un erlenmeyer de 500 ml. Deux aliquots de ce type sont préparés.
- b) La croissance est d'environ trois à quatre jours et s'effectue dans un bain thermostaté à 37°C tout en faisant barboter de l'air dans le milieu à l'aide de pompe à air pour aquarium (Longlife Century) jusqu'à l'obtention d'une densité optique lue à 660nm d'environ 1. A ce moment, nous avons atteint la fin de la phase exponentielle de croissance pour ce volume de culture.

#### 2.1.4 Inoculation

Afin d'augmenter la population de bactéries, nous procédons maintenant à la phase d'inoculation qui consiste à accroître peu à peu le volume du milieu de culture pour permettre aux bactéries d'avoir un environnement frais, toujours rempli des nutriments nécessaires à leur croissance. Cette étape s'effectue comme suit:

- a) Deux fioles à culture de 4 000 ml contenant 1 200 ml de milieu sontensemencées, chacune avec l'inoculum de 100 ml obtenu en 2.1.3 (b).
- b) La croissance dure environ trois jours jusqu'à ce que la densité optique à 660nm ( $D.O._{660}$ ) soit environ égale à 1, dans les mêmes conditions qu'en 2.1.3 (b).
- c) Par la suite, on inocule six fioles à culture de 4 000 ml contenant chacune 1 600 ml de milieu avec 400 ml de l'inoculum obtenu en 2.1.4 (b).
- b) Les microorganismes se reproduisent et croissent pendant trois jours toujours dans les mêmes conditions qu'en 2.1.3 (b).

#### 2.1.5 Induction de la membrane pourpre

A la toute fin de la phase exponentielle de croissance, là où le nombre de bactéries est maximal, nous entreprenons l'étape de la culture où, par des changements de conditions expérimentales, nous faisons induire la synthèse de la membrane pourpre par la bactérie.



En premier lieu, on cesse d'aérer l'ensemencement et par la suite la culture est exposée à quatre lumières incandescentes (450 watts en tout) dont deux sont de 150 W et les deux autres de 75 W, pendant trois jours. Le milieu est agité légèrement pour garder les bactéries en suspension à l'aide d'agitateurs magnétiques submersibles (Bel-Art Canlab, Montréal) propulsés par une pression d'eau constante obtenue par l'utilisation d'une pompe submersible (Simer-Geyser modèle portatif, Launier pompes, Trois-Rivières-Ouest) à laquelle ont été installées six valves indépendantes pouvant se joindre aux six agitateurs requis.

Trois jours plus tard, la membrane pourpre est présente en quantité suffisante et on récolte les bactéries.

#### 2.1.6 Récolte des bactéries

Ce stade consiste à séparer les bactéries de leur milieu de croissance. La suspension bactérienne est donc centrifugée dans un appareil Sorvall RC-5B (8 500 r.p.m. pendant 10 minutes) à 4°C. Par la suite, les bactéries sont lavées deux fois dans une solution basale de sels pour enlever le milieu de culture restant. La solution basale de sels est composée des produits suivants:

|                                        |       |
|----------------------------------------|-------|
| NaCl                                   | 250 g |
| KCl                                    | 2 g   |
| MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O | 20 g  |

pour un volume final de 1 litre de solution. Le pH est ajusté à  $\text{pH} \approx 7$  avec du NaOH.

Leur poids frais est mesuré et elles sont alors déposées dans un bécher (600 ml) où elles sont mises en présence de trois fois leur poids frais de solution basale de sels. On remet en suspension par une agitation mécanique puis 10 mg d'ADNase (Sigma Chemicals Co, St-Louis) y sont rajoutés. L'agitation s'effectue pendant une heure à l'obscurité et l'on obtient un mélange pâteux. Cette suspension est alors dialysée pendant 16 heures à  $4^{\circ}\text{C}$  contre de l'eau distillée avec un changement d'eau après 1:30 heure. C'est à ce moment qu'a lieu la lyse des cellules résultant en des fragments de membranes de grandeurs variables.

#### 2.1.7 Conservation des souches bactériennes

Les souches bactériennes peuvent se conserver très longtemps si on repique les bactéries à partir des géloses déjà ensemencées. Ce repiquage permet aux bactéries de garder un milieu toujours frais et ayant tous les nutriments nécessaires à leur survie.

Pour fabriquer les géloses, 3 g d'Oxoid peptone et 3 g de Bacto Agar (Difco Laboratories, Détroit U.S.A.) sont dissous dans 200 ml de milieu de culture (sans peptone). On chauffe la solution jusqu'à ce qu'elle éclaircisse en la faisant agiter

légèrement. Cette solution est ensuite coulée dans des plats de Petri (environ 10 plats de Petri). Les milieux se gélifient et sont conservés dans un sac de plastique pour éviter qu'ils ne s'assèchent. Les géloses sont repiquées environ tous les trois mois et la croissance des bactéries s'effectue dans un incubateur (Fisher Scientific Co, modèle Isotemp) à 37°C durant dix jours. Elles sont ensuite conservées à 4°C.

## 2.2 Préparation de la membrane pourpre

### 2.2.1 Séparation de la membrane pourpre des débris cellulaires

La membrane pourpre est préparée selon la méthode d'Oosterhelt et Stoeckenius (1971). Afin d'obtenir seulement la membrane pourpre libérée des constituants cellulaires, le dialysat obtenu en 2.1.6 est centrifugé à 9-10 000 r.p.m. pendant 20-25 minutes. Le culot contient des débris cellulaires tandis que le surnageant est constitué de la fraction membranaire des cellules. Ce surnageant est alors centrifugé à 19 000 r.p.m. pendant 1:30 heure. A ce moment, le culot contient la membrane pourpre en majorité tandis que le surnageant est constitué de membranes rouges. Le culot (membrane pourpre) est resuspendu dans l'eau distillée et recentrifugé pendant 1:30 heure. Cette étape est répétée deux à trois fois jusqu'à ce que le surnageant soit presque incolore.

### 2.2.2 Purification de la membrane pourpre

A la membrane pourpre obtenue en 2.2.1 est accolée une partie de membranes rouges contaminantes. Cette étape va permettre une séparation de ces deux types de membranes. Le culot (MP) est donc déposé sur un gradient discontinu de sucrose (7 ml [1,5 M]-21 ml [1,3M]). On procède ensuite à une ultracentrifugation de 48 heures dans le rotor SB-110 de l'appareil IEC modèle B-60 à 27 000 r.p.m. La membrane pourpre sera à l'interface 1,3 et 1,5 M tandis que la membrane rouge se retrouvera au-dessus de la portion contenant 1,3 M de sucrose. La bande pourpre est recueillie et dialysée contre de l'eau distillée pendant 16 heures avec un changement d'eau afin d'éliminer le sucrose. Le dialysat est centrifugé à 19 000 r.p.m. dans l'appareil Sorvall RC-5B pendant 1:30 heure. La membrane pourpre obtenue est alors resuspendue dans la solution basale de sels pour la conservation (0-2 ans). Le rendement en membrane pourpre est évalué d'après le spectre d'absorption en utilisant un coefficient d'extinction ( $\epsilon_{560\text{nm}}$ ) de  $54\,000\text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , tel que suggéré par Oesterhelt et Stoeckenius (1971).

## 2.3 Purification de la bactériorhodopsine de la membrane pourpre

### 2.3.1 Solubilisation de la membrane pourpre et stabilité de la bactériorhodopsine dans les détergents

Afin de déterminer quel détergent sera le plus approprié

pour solubiliser la MP et dans lequel la bR gardera toute son intégrité, une étude comparative de plusieurs détergents mis en contact avec cette portion membranaire a été réalisée.

#### 2.3.1.1 Préparation des échantillons

Dans cinq tubes est déposée 1,25 D.O. de MP remise en suspension dans un tampon phosphate 50 mM (pH 7,0) et sédimentée à 19 000 r.p.m. durant 1:30 heure. Cinq détergents différents ont été utilisés: l'Ammonyx LO, le Triton X-100, l'acide cholique, l'Emulphogène BC-720 et le L-1690, un ester d'acide laurique et de sucrose (voir figure 5). Pour chacun d'eux, une solution à 2% dans un tampon phosphate 50 mM (pH 7,0) est préparée. Dans les cinq tubes respectifs, la MP est remise en suspension dans 5 ml de chacune de ces solutions de détergents.

#### 2.3.1.2 Méthode expérimentale

Avec les cinq détergents choisis, nous allons étudier la solubilité de la MP après un temps d'interaction défini et la stabilité de la bR à des températures contrôlées. La solubilisation dure 20 minutes à 4 °C sous agitation continue et la MP est centrifugée à 19 000 r.p.m. pendant 1:30 heure afin d'éliminer les portions de membranes ne s'étant pas solubilisées durant

cette période. Ceci permet aussi de connaître la quantité de MP capable de se solubiliser dans le temps convenu.

Le surnageant est ensuite divisé en deux parties qui sont gardées à deux températures respectives: soit à 4 et 22°C. Cette étude a été refaite en n'employant que deux détergents (L-1690 et acide cholique) dans les mêmes concentrations en augmentant le temps de solubilisation à quatre jours et une partie du surnageant est gardée cette fois à 30°C dans un bain thermostaté. L'évolution de la bR dans les différents détergents est suivie par la spectroscopie d'absorption en comparant la bande à 550 nm, caractéristique de la bR dans les détergents, à la bande à 387 nm, spécifique au rétinale libre.

## 2.3.2 Séparation des lipides de la protéine

### 2.3.2.1 Principe de la méthode

La méthode de purification choisie est la chromatographie par interaction hydrophobe. Elle est basée sur le fait que les protéines possédant des résidus superficiels non-polaires s'adsorbent à des groupements non-polaires fixés à un ligand. La bR et les

lipides pourraient s'adsorber au gel à différents degrés, c'est-à-dire que les interactions pourraient être plus ou moins hydrophobes dépendant de la nature des composants. Lors de l'élution, il y a tout lieu de croire que les protéines et les lipides puissent être relâchés dans des fractions séparées dépendant de leur force d'attachement.

#### 2.3.2.2 Méthode expérimentale

La MP (15,7 D.O.) est solubilisée dans 10 ml d'une solution de L-1690 (2%) dans un tampon phosphate 50 mM (pH 7,0). Cette solubilisation dure quatre jours à 4°C sous agitation continue. Toutes les étapes de cette méthode se déroulent à l'obscurité. La MP est ensuite sédimentée à 19 000 r.p.m. (1:30 heure) et le surnageant est dilué 20 fois dans le tampon phosphate.

Le gel de Phenyl Sépharose CL-4B est introduit dans une colonne à chromatographie (Pharmacia Fine Chemicals, Upsala Suède) avec une solution à 0,2% de L-1690 dans le même tampon. La membrane solubilisée est chargée sur la colonne à 4°C. L'élution s'effectue en lavant le gel soit avec du L-1690 0,2% ou avec un gradient de L-1690 (0,2-0,5%). L'expérience a été

reprise en substituant le tampon phosphate 50 mM (pH 7,0) par un tampon Tris-HCl 25 mM (pH 7,0). Le rendement de la chromatographie est mesuré par spectroscopie d'absorption.

#### 2.3.2.3 Etude de la bactériorhodopsine purifiée par chromatographie sur couche mince

Cette technique est utilisée pour déterminer dans quelle proportion les échantillons de bR résultant de la chromatographie hydrophobe sont libérés des lipides membranaires. Les échantillons de bR purifiée ont été étudiés comparativement à la MP native, au détergent L-1690 et aux premières fractions d'élu-tion.

Les plaques de Silica gel G 250 microns (Analtech Inc., Newark Delaware) sont activées pendant 1:30 heure à 100°C dans un incubateur et sont refroidies dans un dessiccateur. L'extraction de lipides des échantil-lons est réalisée par un mélange  $\text{CHCl}_3$ :MeOH:NaCl 0,9% (8 : 4 : 3). La phase de chloroforme, contenant les lipides, est recueillie et évaporée à l'aide d'un roto-évaporateur (Brinkmann modèle R 110, Ontario). Les lipides de chaque échantillon sont dissous dans le chloroforme et déposés sur la plaque à l'aide d'une microsiringue de 10 ou 25 microlitres. Les plaques sont ensuite placées dans la chambre à chro-



matographie où la migration s'effectue. La phase mobile est constituée d'un mélange  $\text{CHCl}_3$  :  $\text{MeOH}$  :  $\text{H}_2\text{O}$  (65 : 35 : 4). La révélation se fait par un réactif mis au point par Ryu et MacCoss (1979) qui colore tous les phospholipides en bleu immédiatement après la vaporisation. Tous les lipides sont ensuite révélés par chauffage de la plaque. Des images de ces plaques sont obtenues par reprographie et les chromatogrammes sont obtenus au moyen d'un densitomètre à balayage (Clifford Instruments, modèle 445).

### 2.3.3 Délipidation de la bactériorhodopsine (deuxième méthode)

Cette méthode de délipidation est la somme de deux techniques dont l'une est utilisée par Huang et coll. (1980) à laquelle est ajoutée celle qui est décrite à la section 2.3.2.

La MP (30 D.O.) est solubilisée dans 0,5cc d'une solution à 5% de Triton X-100 dans un tampon acétate 100 mM (pH 5,0) et soumise à une agitation périodique pendant deux jours à 20°C par l'utilisation d'un vortex. Toutes les opérations s'effectuent à l'obscurité. Le mélange est sédimenté à 8 000 g pendant deux minutes et le surnageant est chargé sur une colonne de Biogel A-0,5 M (1,5 X 100 cm) prééquilibrée avec un tampon Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, acide déoxycholique 0,25% et  $\text{NaN}_3$  0,025% à pH 8,0 et à 4°C. L'élution s'effectue avec ce même tampon. Les

fractions contenant la bR sont recueillies et mesurées par spectroscopie d'absorption. Elles sont ensuite chargées sur une colonne de Phényl Sépharose CL-4B (chromatographie par interaction hydrophobe) préalablement équilibrée avec le même tampon utilisé lors du tamis moléculaire. Le gel est lavé avec dix fois le volume de la colonne de tampon phosphate 50 mM (pH 7,0) et l'élution est amorcée par l'introduction d'un gradient de L-1690 (0,2-0,5%) dans le tampon phosphate. On procède ensuite à une ultrafiltration sur filtre PM 10 Amicon (Amicon Corp., Lexington, Massachusetts) des fractions de bR recueillies et mesurées spectralement afin de concentrer l'échantillon de protéine. L'évaluation du rendement se fait par la spectroscopie d'absorption.

## 2.4 Techniques spectroscopiques

### 2.4.1 Absorption

Les spectres d'absorption ont été mesurés par l'utilisation d'un spectrophotomètre enregistreur UV-visible Pye Unicam SP 8-100 (Canlab, Montréal) muni d'un accessoire porte-échantillon pour échantillons diffus permettant d'enregistrer les spectres sans qu'ils ne soient faussés à cause de la lumière diffusée par l'échantillon.

Certaines expériences ont requis l'utilisation d'un spectrophotomètre UV-visible Cary 17D (Varian, Georgetown, Ontario)

muni d'une fenêtre latérale permettant d'éclairer l'échantillon et auquel peut s'adapter des accessoires servant à l'analyse d'échantillons à basse température.

#### 2.4.2 Accessoires de basse température

La fenêtre latérale du spectrophotomètre d'absorption Cary 17-D permet l'installation d'un filtre interférentiel soit à 450 ou 550 nm dépendant de l'intermédiaire de la bR qu'on désire exciter lorsqu'on utilise une source d'excitation qui est en l'occurrence un projecteur à diapositives (Ditric Optics Inc. modèle 4400 JPJ C3). dont le faisceau de la lampe est le plus concentré possible sur le filtre choisi.

Un cryostat (Oxford Instruments, Oxford, Angleterre) peut être installé au niveau du compartiment de l'échantillon du Cary 17-D. Le cryostat se joint à une unité de contrôle de température et à un débitmètre contrôlant le pompage de l'azote liquide. L'échantillon est déposé dans le porte-échantillon lui-même inséré dans le cryostat. L'échantillon est aligné de manière à donner une absorbance minimale à 700 nm et le zéro est ajusté par une suppression d'absorbance.

##### 2.4.2.1 Méthode expérimentale

Le cryostat est pompé sous vide quelques heures avant l'expérimentation pour permettre une bonne descente des températures. L'échantillon de bR est en

solution dans le glycérol (50-70%) pour obtenir la formation d'un verre transparent aux basses températures. Un spectre de l'échantillon à la température ambiante ( $298^{\circ}\text{K}$ ) est enregistré puis l'échantillon est refroidi jusqu'à la température désirée ( $298$  à  $77^{\circ}\text{K}$ ) par l'ouverture du débit d'azote. On enregistre de nouveau un spectre à la température obtenue. Puis on procède à l'excitation de l'échantillon par illumination durant 10-15 minutes avec le filtre adéquat à l'analyse effectuée. Lors des excitations lumineuses, la fente, la lampe et le photomultiplicateur du spectrophotomètre sont fermés. Après illumination, un spectre est mesuré afin d'observer les transitions s'étant effectuées. On peut ensuite réchauffer l'échantillon et l'analyser à une autre température si on le désire.

#### 2.4.3 Dichroïsme circulaire

Les spectres de dichroïsme circulaire ont été obtenus à l'aide d'un spectropolarimètre Jasco (modèle S-20). Cet instrument initialement prévu pour la mesure des spectres de dispersion optique rotatoire a été modifié pour mesurer des spectres de dichroïsme circulaire par Sproul Scientific.

## 2.5 Effet du pH sur la bactériorhodopsine purifiée

Cette expérience permet de connaître la stabilité, la résistance et la nature de la bR purifiée pour des valeurs de pH connues. Les échantillons de bR délipidée sont soumis à une vaste gamme de pH et les spectres d'absorption sont mesurés pour chaque valeur de pH obtenue. Le pH est déterminé par l'utilisation d'un pH mètre (Corning modèle 10, Medfield Massachusetts). L'étendue des mesures varie entre pH 1,5 et 12, et est ajustée avec du NaOH ou du HCl ( $\sim 0,1$  N). A l'analyse spectrale, le ou les maximums d'absorption ainsi que les rapports entre ceux-ci sont calculés.

## 2.6 Effet de l'hydroxylamine et du borohydrure de sodium

### 2.6.1 Principe

Sous illumination, l'intermédiaire  $M_{412}$  de la bR contenue dans la MP réagit normalement avec l'hydroxylamine et le borohydrure de sodium résultant en la perte du lien de base de Schiff entre l'apoprotéine (l'opsine) et le chromophore (le rétinale), ceci étant dû par un changement conformationnel de l'apoprotéine. L'effet de ces produits à l'obscurité sur la bR purifiée pourrait donc nous fournir des informations à savoir si la protéine conserve la même conformation lorsqu'elle n'est plus en présence des lipides membranaires.

### 2.6.2 Méthode expérimentale

A la bR délipidée est ajoutée de l'hydroxylamine neutralisée (10 mM) ou quelques grains de borohydrure de sodium et l'évolution de ces produits sur la bR est mesurée par la spectroscopie d'absorption en comparant la bande à 540 nm caractéristique de la bR délipidée avec la bande à 380 nm caractéristique au rétinol libre. Toutes ces opérations sont réalisées à l'obscurité.

### 2.7 Produits chimiques

Voici la liste des produits utilisés:

- Les produits chimiques usuels: Fisher Scientific Co. Montréal grade Reagent.
- Le NaCl (gros sel crystal séché Windsor): Ritchie Feed and Seed Co. Ontario.
- L'ADNase (grade I): Sigma Chemical Co. St-Louis.
- Le détergent L-1690: Ryoto Co. Ltd Tokyo.
- L'Ammonyx LO: Onyx Chemical Co. New Jersey.
- L'Emulphogène BC-720: Chemical development of Canada Ltd.
- L'acide cholique: Sigma Chemical Co. St-Louis.

- Le Phényl Sépharose CL-4B: Pharmacia Fine Chemicals, Upsala, Suède.
- Le Biogel A-0,5 M (200-400 mesh): Biorad Laboratory Richmond, Californie.

## CHAPITRE III

### RESULTATS ET DISCUSSION

#### 3.1 Préparation de la membrane pourpre

##### 3.1.1 Conditions de culture

La culture de bactéries nécessite un environnement stable tenant compte des conditions physico-chimiques propres à la croissance de l'espèce bactérienne étudiée. La méthode expérimentale utilisée en 2.1 pour la culture de *Halobacterium* n'est certes pas la meilleure puisqu'elle s'effectue en système ouvert, s'exposant ainsi aux fluctuations de l'air environnant.

L'obtention des conditions optimales de croissance requiert l'utilisation d'un incubateur approprié permettant d'agiter et d'éclairer les ensemencements en milieu fermé tout en ayant une température contrôlée.

##### 3.1.2 Rendement de membranes pourpres

L'uniformité des conditions de culture est primordiale pour la synthèse de la membrane pourpre. Plusieurs souches (citées en 2.1.1) de *Halobacterium* ont été cultivées mais nous avons éprouvé beaucoup de difficulté par rapport à la croissance des bactéries de certaines souches. Heureusement, les souches  $R_1$  et  $S_q$  de *Halobacterium halobium* étant plus fa-



ciles à cultiver, nous avons réussi à obtenir de la membrane pourpre en assez grande quantité. Le rendement de la culture se situe environ à 20 mg de membrane pourpre par litre de milieu. Il faut considérer que, bien que n'ayant pas l'incubateur approprié, le rendement obtenu est très satisfaisant par rapport à ceux des autres chercheurs (20-50 mg litre<sup>-1</sup>) (Oesterhelt et Stoeckenius 1971).

### 3.1.3 Analyse spectrale de la membrane pourpre

La figure 6 montre le spectre d'absorption de la membrane pourpre. Ce spectre est caractérisé par une bande d'absorption centrée à 560 nm (forme adaptée à l'obscurité) caractéristique du complexe rétinale-opsine c'est-à-dire la bactériorhodopsine, en plus de la bande à 280 nm spécifique aux acides aminés aromatiques. La pureté spectrale, c'est-à-dire le rapport des absorbances à 280 et 560 nm pour les échantillons obtenus est d'environ 1,7 par comparaison à des valeurs obtenues par Oesterhelt et Stoeckenius(1971).

### 3.2 Solubilisation de la membrane pourpre

La bR est la seule protéine contenue dans la membrane pourpre. En poids sec, ces membranes contiennent près de 80% de bR et 20% de lipides, ce qui correspond environ à 7 molécules de lipides par molécule de protéine (Kates et al. 1982), les lipides polaires comptant pour 6 molécules par molécule de bactériopsine. La plupart des lipides de la MP ont une charge négative et on leur attribue une fonction de régulation de l'activité de pompage de protons consécutive à l'absorption de la lu-

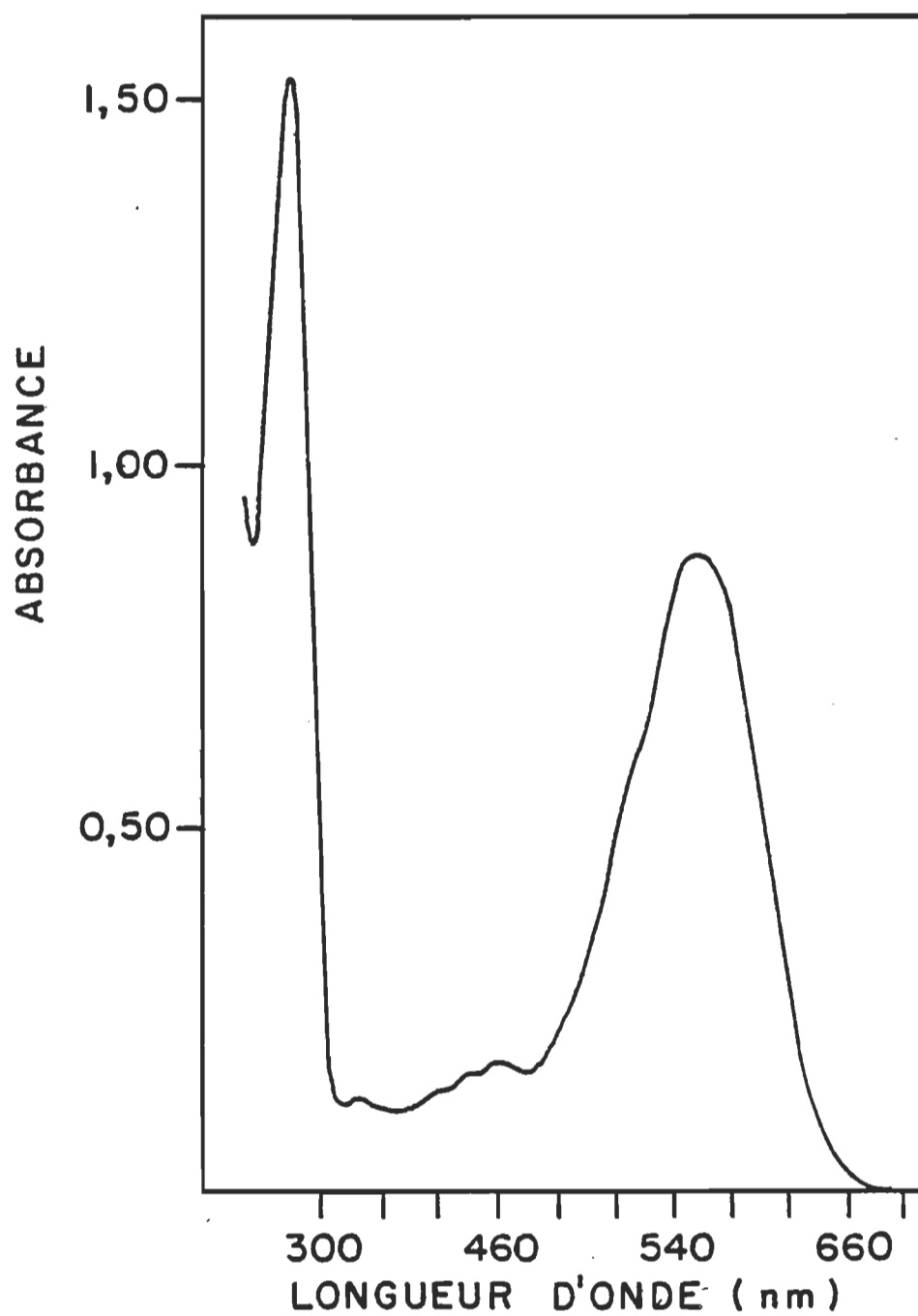


Figure 6 : Spectre d'absorption de la membrane pourpre adaptée à l'obscurité,  $\lambda_{\text{max}} = 560 \text{ nm}$ .

mière par la bR (Højeberg et al. 1982). Pour bien comprendre la photochimie de la bR, il est donc important de pouvoir comparer son comportement dans sa membrane native et sous une forme purifiée, délipidée.

Cependant, le problème qui se pose avec la bR est que, contrairement au pigment visuel la rhodopsine, cette protéine possède une stabilité relativement faible dans la plupart des détergents commerciaux disponibles lorsque ceux-ci sont utilisés à des concentrations suffisantes pour effectuer la délipidation. Jusqu'ici, la plupart des travaux concernant cet aspect se sont heurtés à deux obstacles majeurs soient: la difficulté de solubiliser la MP afin de délipider la bR et l'instabilité de la bR dans beaucoup de détergents. En effet, la bR est une protéine très stable dans une vaste gamme de température et de pH lorsqu'elle est contenue dans la membrane pourpre mais elle devient une protéine très fragile lorsqu'on solubilise la MP. Nous avons donc voulu faire une étude comparative de la bR lorsqu'elle est mise en contact avec différents détergents afin de déterminer lequel sera le plus adéquat pour poursuivre les expériences.

### 3.2.1 Stabilité de la bactériorhodopsine dans les détergents

Cinq détergents ont été choisis: l'Ammonyx LO, l'Emulphogène BC-720, l'acide cholique, le Triton X-100 et le L-1690 ou lauryl sucrose dans lesquels nous avons étudié la solubilité de la MP après 20 minutes d'interaction et la stabilité de la bR en fonction du temps, à 4<sup>0</sup> et 22<sup>0</sup>C. L'évolution de cette protéine dans les différents détergents a été suivie par

la spectroscopie d'absorption en comparant les bandes à 550 et 387 nm. La bR en solution dans les détergents a un  $\lambda_{\text{max}}$  à 550 nm et la bande d'absorption à 387 nm est spécifique au rétinale libre. La figure 7 nous montre l'exemple de la dénaturation progressive des membranes pourpres lorsqu'elles sont solubilisées dans 2% (p/v) d'Emulphogène. Après la solubilisation des MP, la bR se dénature et nous observons une diminution graduelle du maximum d'absorption à 550 nm et une augmentation simultanée de la bande à 387 nm correspondant à la forme dénaturée de la bR. La vitesse à laquelle ce processus de dégradation se produit varie énormément d'un détergent à l'autre. Une indication de cette variabilité est représentée à la figure 8 où le rapport des bandes d'absorption à 390 et 550 nm ( $A_{390/550}$ ) a été mesuré en fonction du temps écoulé à 22°C après la solubilisation, ce rapport augmentant en relation avec la dénaturation progressive de la protéine.

Ainsi, dans l'Ammonyx LO, la MP est très soluble mais la bR subit une dénaturation très marquée deux heures après qu'elle ait été mise en contact avec le détergent, à 4°C. Trois jours plus tard, elle est complètement dégradée. A 22°C, ceci se produit plus rapidement de telle sorte qu'après une journée, la bR est complètement disparue.

L'acide cholique, pour sa part, ne semble pas posséder la propriété de solubiliser la membrane pourpre car même

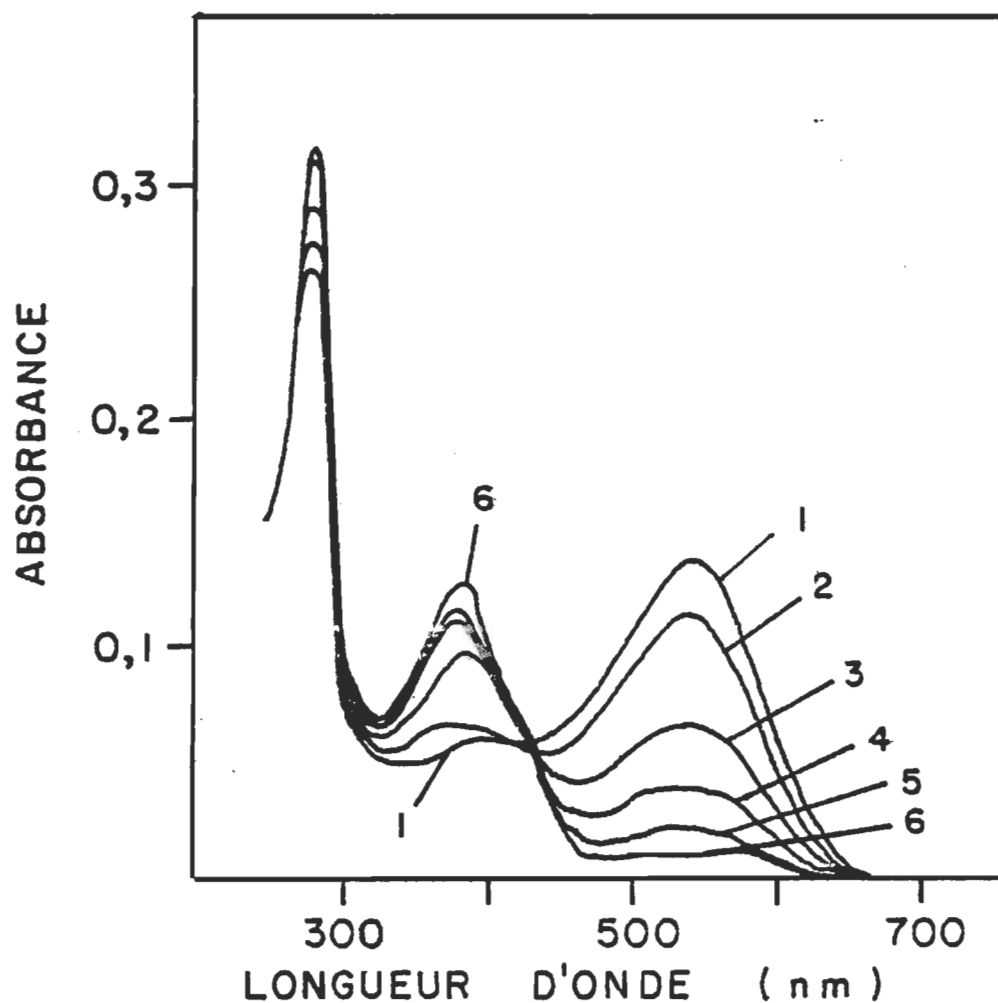


Figure 7 : Changements spectraux observés lors de la solubilisation à 4°C des membranes pourpres dans une solution à 2% (p/v) d'Emulphogène BC-720 dans un tampon phosphate 50 mM (pH=7). Les spectres sont enregistrés à: (1) 3 heures, (2) 25 heures, (3) 7 jours, (4) 10 jours, (5) 14 jours, (6) 21 jours après la solubilisation.

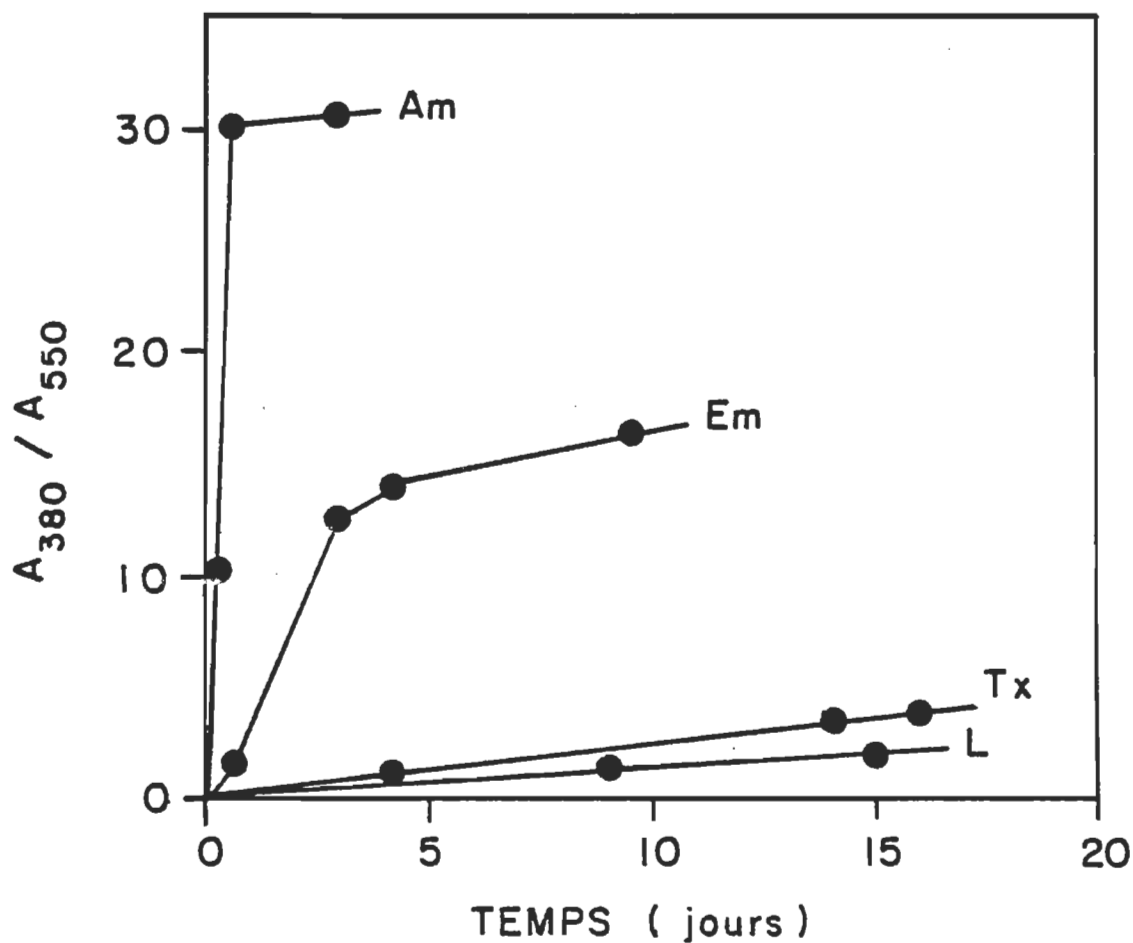


Figure 8 : Dénaturation progressive de la bactériorhodopsine ( $A_{380}/A_{550}$ ) en fonction du temps dans différents détergents. Les échantillons de membranes pourpres sont solubilisés à 22°C dans l'Ammonix LO (Am), l'Emulphogène BC-720 (Em), le Triton X-100 (Tx) et le lauryl sucrose (L).

après quatre jours d'interaction, le surnageant ne contient que très peu de bR, ceci se manifestant par l'absence d'absorption à 550 nm. Donc, l'acide cholique tout comme l'Ammonyx ne sont pas adéquats pour poursuivre des études ultérieures.

En ce qui concerne l'Emulphogène BC, il solubilise très bien la MP mais à 4°C, la bR se dénature progressivement: il en reste 50% après trois jours et elle disparaît complètement en trois semaines. A 22°C, la régression est plus rapide: il en disparaît 50% en 16 heures et après 1½ semaine elle est toute dénaturée. Ainsi, malgré la capacité de l'Emulphogène à solubiliser complètement la MP, l'utilisation de ce détergent n'est pas recommandable, la bR n'y étant pas stable assez longtemps.

Lorsque le Triton X-100 est utilisé, nous observons qu'il solubilise assez bien la MP mais le rendement est inférieur à celui obtenu avec l'Emulphogène. Cependant, si nous laissons interagir le Triton X-100 et la MP plus longtemps (deux jours), nous croyons qu'il serait très efficace pour solubiliser la membrane. Quant à la stabilité de la protéine, à 4°C, le Triton affecte très lentement la bR. Après 3½ semaines, 60% de la bR demeure encore intacte. A 22°C, 50% de la bR est dégradée après 3 jours et la disparition complète s'effectue au bout de 4 semaines. Ce détergent fut d'ailleurs déjà utilisé pour des expériences avec la bR

(Dencher et Heyn 1978, Huang et al. 1980, Lam et Packer 1983) parce qu'il offre des conditions relativement satisfaisantes pour la conservation de cette protéine par comparaison aux trois autres détergents cités auparavant.

Enfin, le dernier détergent employé est le L-1690 ou lauryl sucrose. Au bout de 20 minutes d'interaction avec la MP, le degré de solubilisation étant très faible, nous avons prolongé le temps de solubilisation à 4 jours. Nous observons alors qu'à 4°C, la bR est encore intacte après trois semaines alors qu'à 22°C, 50% de la protéine est dénaturée après 1½ semaine. Des expériences effectuées à 30°C démontrent que 50% de la bR est présente après une semaine.

### 3.2.2 Etat d'agrégation de la bactériorhodopsine dans les détergents

Dans la membrane pourpre, les molécules de protéines sont regroupées en trimères de bR et il semble qu'il y ait des interactions entre les différents chromophores. Ces interactions rétinale-rétinale (exciton) entre les chromophores dans l'état trimérique donne lieu à une bande excitonique positive sur le spectre de dichroïsme circulaire (DC) de la MP. Il existe aussi deux autres bandes sur le spectre de dichroïsme circulaire (dont l'une est positive et l'autre négative) qui proviennent des interactions rétinale-protéine (Becher et Ebrey 1976).



Mis à part ceux qui ont des régions hydrophobes rigides comme le cholate, le deoxycholate ou le taurocholate (Padros et al. 1984), la plupart des détergents peuvent solubiliser la MP et le processus de solubilisation est toujours accompagné par des changements spectraux dans la molécule de bR. La solubilisation monomérisé la bR et fait disparaître le dichroïsme circulaire de l'exciton (Dencher et Heyn 1978). Cet effet est observable lors de la solubilisation de la MP dans le lauryl sucrose comme on peut le voir dans la figure 9 où les spectres de DC de la membrane native (bR dans l'état trimérique) et de la membrane solubilisée (bR monomère) sont comparés. L'absence de la bande excitonique dans la membrane solubilisée indique que le lauryl sucrose désagrège les trimères de bR aussi bien que les autres détergents.

### 3.2.3 Etat fonctionnel de la bactériorhodopsine solubilisée

Une des façons de vérifier l'intégrité fonctionnelle de la bR consiste à mesurer sa propriété d'adaptation à la lumière. La bR native existe sous deux formes stables et interconvertibles: une forme adaptée à l'obscurité constituée d'un mélange équimolaire de tout-trans et 13-cis rétinol ayant un maximum d'absorption centrée autour de 560 nm, laquelle se convertit par une courte exposition à une source lumineuse intense en une bR adaptée à la lumière, ne contenant que du tout-

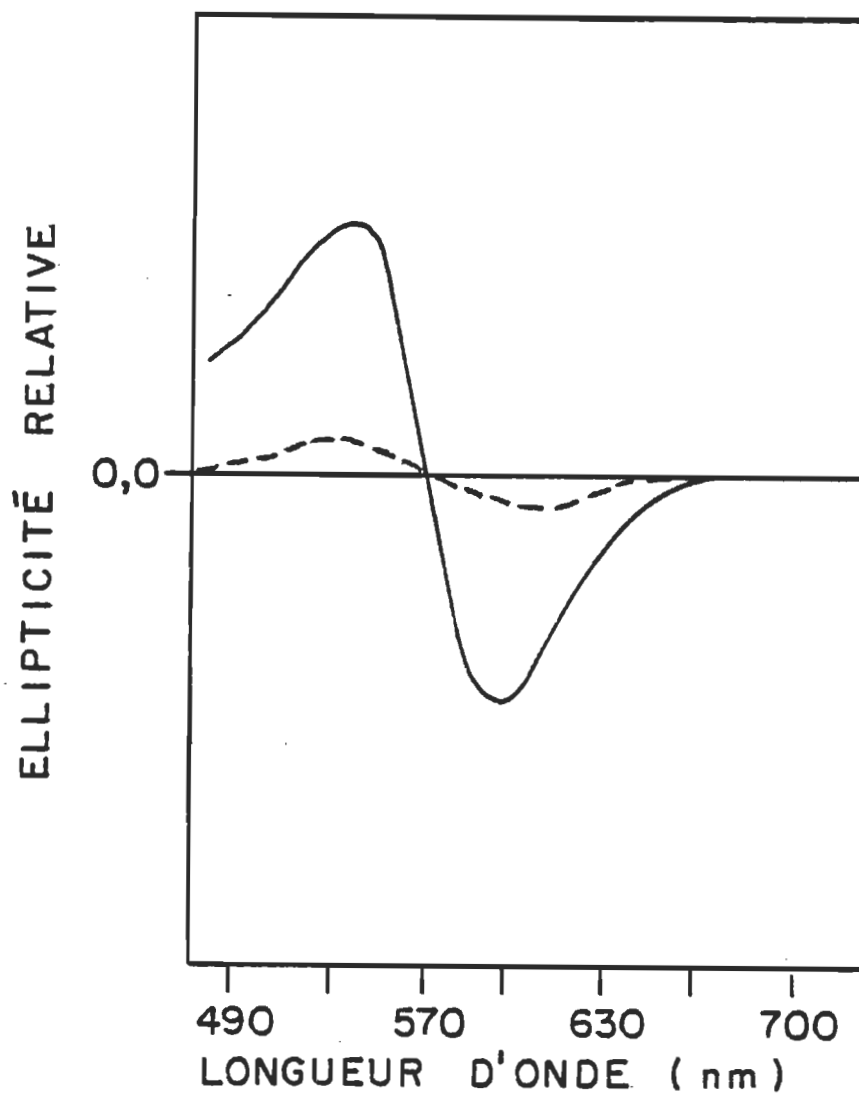


Figure 9 : Atténuation du couplet excitonique, observé par dichroïsme circulaire, lors de la solubilisation de la bactériorhodopsine.

(—) Dichroïsme circulaire de la membrane pourpre dans un tampon phosphate 50 mM (pH=7).  $A_{560} = 0,7$

(---) Même échantillon en présence de lauryl sucrose 2%.

trans rétinale et absorbant à 570 nm (Oesterhelt et al. 1973). Cette réaction implique donc une isomérisation du 13-cis en tout-trans rétinale.

Dans la membrane pourpre solubilisée dans le L-1690 à pH 7, la bR est monomérique et a un maximum d'absorption à 550 nm ( $bR_{550}$ ) lorsqu'elle est adaptée à l'obscurité (voir figure 10). Par contre, si cette bR solubilisée est exposée à la lumière pour quelques minutes, la position de la bande d'absorption subit un déplacement bathochrome d'environ 5 nm; ce  $\lambda_{\text{max}} = 555$  nm correspondant à la forme adaptée à la lumière de la bR solubilisée soit  $bR_{555}$ . Si, par la suite, l'échantillon est remis dans des conditions d'obscurité pendant environ 45 minutes, la bande d'absorption réitère sa position initiale à 550 nm. La bR solubilisée conserve donc les propriétés fonctionnelles de la membrane pourpre native.

#### 3.2.4 Discussion

Tandis que quelques détergents comme l'acide cholique ou deoxycholique ont un effet solubilisant très faible sur la MP, la plupart des autres partagent comme caractéristique commune, un effet perturbateur sur les interactions natives chromophore-protéine et ils induisent la perte des caractéristiques d'absorption de la bR. Les détergents les plus puissants comme l'Ammonyx LO et l'Emulphogène sont les plus rapides pour

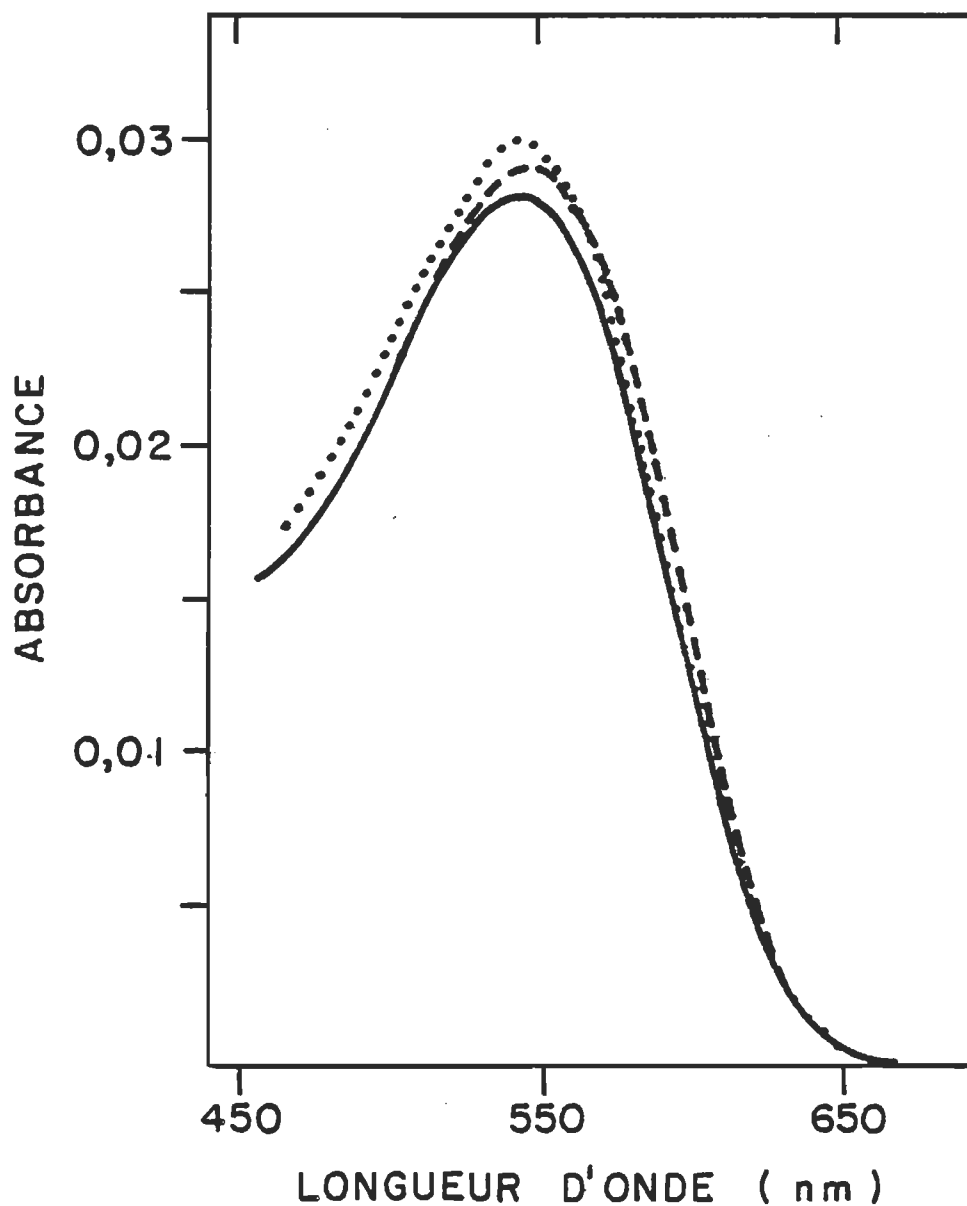


Figure 10 : Adaptation à la lumière de la bactériorhodopsine solubilisée dans 2% (p/v) de L-1690 dans un tampon phosphate 50 mM (pH=7)

- (.....) Spectre d'absorption de la bactériorhodopsine dans sa forme adaptée à l'obscurité,  $\lambda_{\text{max}} = 550 \text{ nm}$
- (----) Spectre d'absorption de la bactériorhodopsine dans sa forme adaptée à la lumière  $\lambda_{\text{max}} = 555 \text{ nm}$
- (—) Spectre d'absorption de la bactériorhodopsine gardée à l'obscurité pendant 45 minutes après l'adaptation à la lumière.

dénaturer la protéine tandis que les plus doux (Triton X-100, L-1690) retiennent les interactions spécifiques rétinale-protéine beaucoup plus longtemps.

Nous remarquons aussi que la vitesse de solubilisation de la membrane pourpre varie proportionnellement avec le degré de dénaturation de la bR dans les différents détergents, c'est-à-dire que les détergents qui solubilisent bien la MP dénaturent aussi bien la bR. Parmi ceux-ci, le lauryl sucrose s'avère le meilleur pour conserver l'intégrité spectrale de la bR. Dans ce détergent, la bR se solubilise très lentement mais il semble être le plus approprié pour entreprendre des expériences de longue durée car la bR se conserve apparemment sans modifications spectrales durant plus d'un mois à 4°C.

De plus, tandis que la solubilisation avec des détergents anioniques induit un déplacement bathochrome du maximum d'absorption de la bR (Padros et al. 1984), les détergents non-ioniques, pour leur part, induisent tous un déplacement hypsochrome d'environ 10 nm de l'absorption du rétinale dans la bR (Huang et coll. 1980, Dencher et Heyn 1978, Lam et Packer 1983, Naito et al. 1981). Des études effectuées par Lam et Packer (1983) suggèrent fortement que ce déplacement résulte d'altérations dans les interactions rétinale-apoprotéine en présence des

détergents. En effet, dans le but de caractériser les interactions existant entre les détergents et la bR, Lam et Packer ont traité les membranes pourpres avec du glutaraldéhyde avant leur solubilisation dans les différents détergents non-ioniques. Le glutaraldéhyde préserve la structure trimérique native de la MP, même lorsqu'elle est en présence des détergents et cet effet est remarqué par la conservation de la bande excitonique du spectre de dichroïsme circulaire. Malgré la différence de l'état d'agrégation des molécules de bR dans les échantillons de MP non traités (monomère) ou traités au glutaraldéhyde (trimère), Lam et Packer ont observé un déplacement hypsochrome de la bande d'absorption comparable dans les deux cas. Ainsi, la monomérisation ne semble pas être responsable des changements observés dans les caractéristiques spectroscopiques de la bR. Les effets se manifestant après la solubilisation des MP par les détergents non-ioniques ont donc été attribués à des interactions ayant lieu entre le détergent et la bR.

Les membranes pourpres solubilisées dans le lauryl sucrose ont une  $\lambda_{\text{max}}$  à 550 nm, 10 nm de moins que les membranes pourpres natives. Donc le lauryl sucrose affecte la liaison rétinale protéine de la même manière que les autres détergents non-ioniques. Toutefois, ces modifications de l'état d'agrégation et des interactions rétinale-protéine ne privent pas la bR de sa capacité d'adaptation à la lumière, tel que démontré dans la section 3.2.3.

### 3.3 Délipidation de la bactériorhodopsine

Comme le maintien des interactions natives rétinale-protéine semble être optimal dans le lauryl sucrose, nous avons tenté d'accomplir la délipidation complète de la bR dans ce détergent. Parmi les différentes méthodes que nous avons expérimentées dans le but de séparer les lipides membranaires de la protéine, le meilleur degré de délipidation a été obtenu par la chromatographie par interaction hydrophobe sur gel de Phényl Sépharose CL-4B.

#### 3.3.1 Chromatographie par interaction hydrophobe

La MP est composée à 90% de lipides chargés et 10% de lipides neutres en plus de la bR qui est une protéine ayant un haut contenu en acides aminés neutres (en particulier la phénylalanine) lui conférant un caractère très hydrophobe.

La figure 11 montre le patron d'élution de la bR provenant de cette colonne. Lorsque la MP solubilisée dans le L-1690 est introduite sur un gel de Phényl Sépharose préalablement équilibré avec du lauryl sucrose (0,1% P/v), la bR s'adsorbe fortement au tiers supérieur du gel et lors de l'élution, la protéine se détache très lentement, ce qui confirme qu'elle s'accroche réellement à ce type de support. Dépendant du profil du gradient de détergent utilisé, le volume d'élution peut varier de 200 à 1 200 ml. Dans ce cas-ci, un gradient de concentration discontinu de 0,1 à 0,2% de détergent a été utilisé pour l'élution. La bR est éluee après

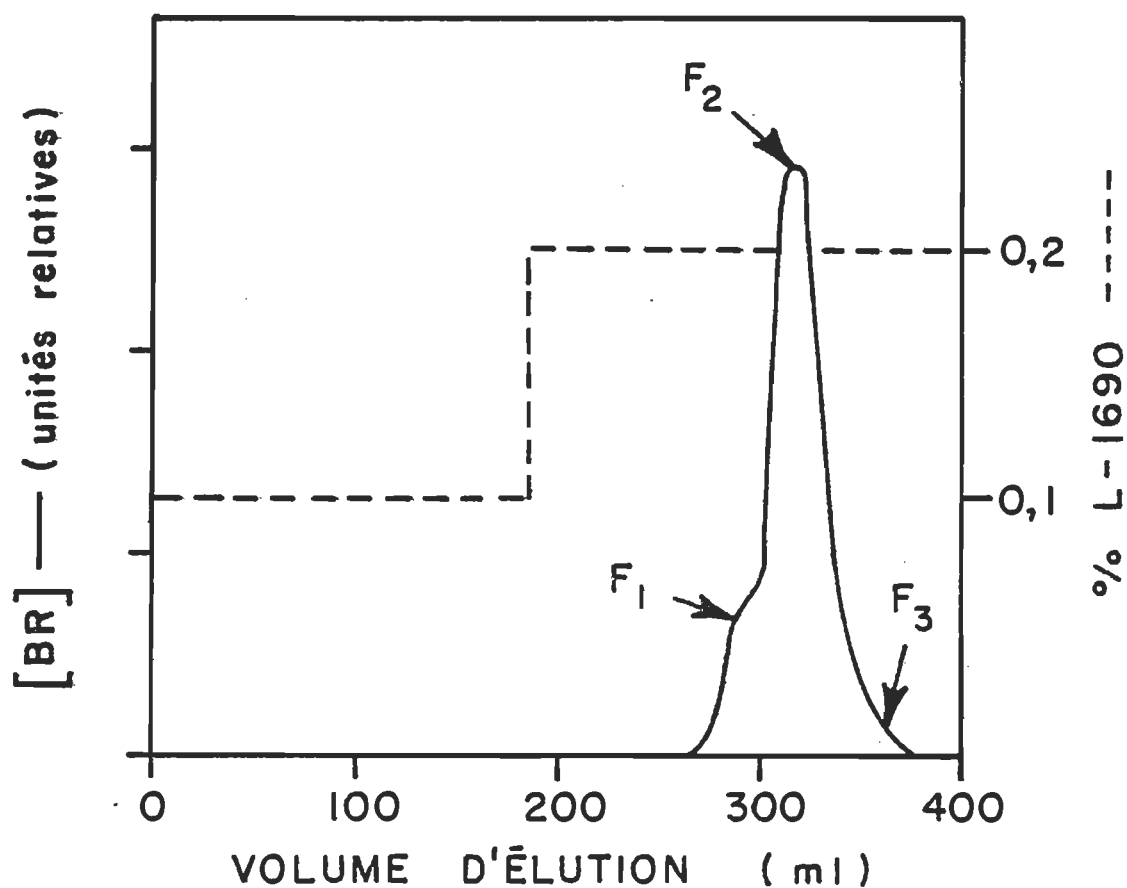


Figure 11 : Profil d'élution de la bactériorhodopsine adsorbée sur une colonne de Phényl Sépharose CL-4B (volume de colonne : 10 ml). La concentration de la bactériorhodopsine (—) a été évaluée à partir de l'absorbance obtenue à 540 nm. La protéine a été éluée avec un gradient discontinu (---) de lauryl sucrose. F1, F2 et F3 sont décrits à la figure 12.



environ 100 ml de lauryl sucrose 0,2%.

Les différentes fractions d'élution ont été étudiées par spectroscopie d'absorption et la figure 12 nous montre les caractéristiques d'absorption obtenues. Les premières fractions (F1) d'élution n'interagissent pas ou très peu avec le gel et elles semblent contenir les caroténoïdes provenant de la membrane rouge contaminant toujours un peu les échantillons de MP, lesquels ont des bandes d'absorption centrées à 540 et 500 nm en plus du rétinol absorbant à 380 nm qui proviendrait de la bR déjà dénaturée en bactériopsine et rétinol lors de l'incorporation dans la colonne.

Les fractions suivantes (F2) sont pourpres et contiennent la bR dont le spectre d'absorption montre la bande caractéristique à 550 nm. Enfin, les dernières fractions (F3), s'éluant après la protéine, s'accrochent encore plus fortement au gel et sont constituées de bR spectralement différente de la bR native qu'on retrouve dans la fraction (F2). En effet, il apparaît une bande d'absorption à 405 nm au fur et à mesure de l'élution. Cette bande s'apparente de près à l'un des intermédiaires du photocycle de la bR, la méta-bR, qui absorbe vers 410 nm. Nous croyons qu'en présence du détergent, la longueur d'onde maximale est déplacée légèrement vers les régions de l'U.V.. Ceci porte à croire que des changements conformationnels de la bR native pourraient être induits soit

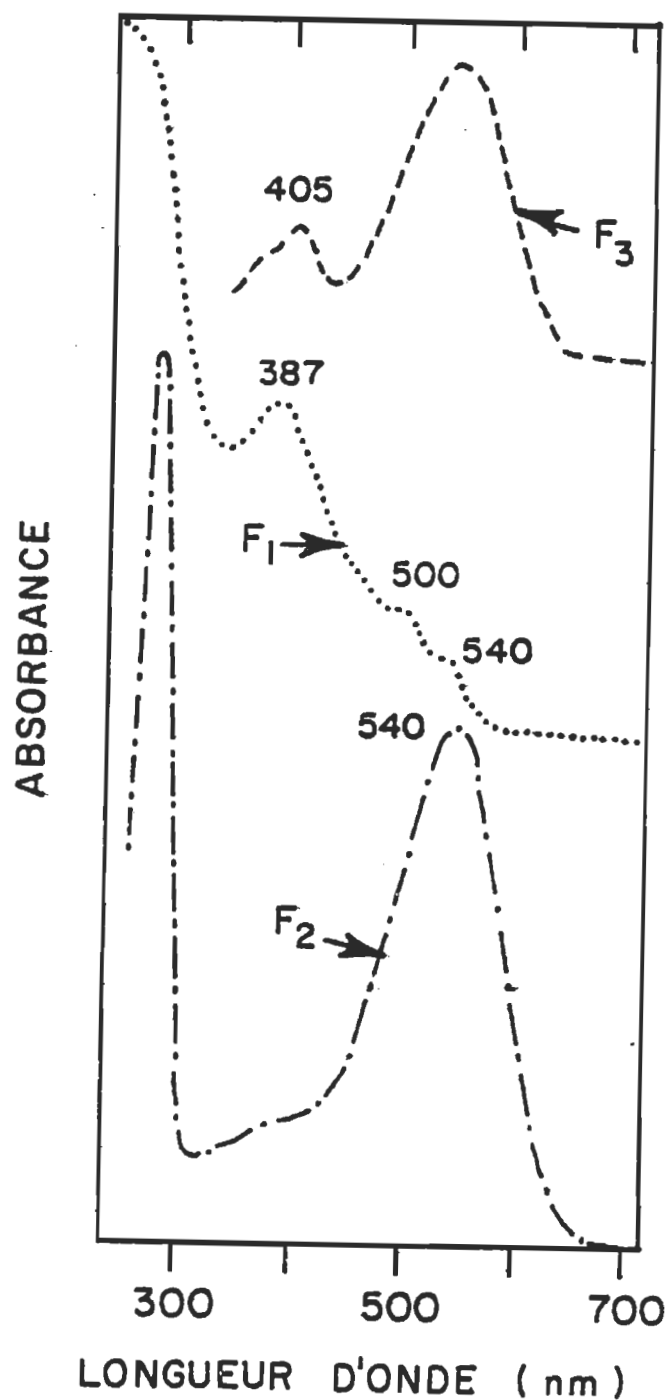


Figure 12 : Spectres d'absorption des fractions (F1), (F2) et (F3) obtenues lors de la chromatographie sur gel de Phényl Sépharose CL-4B de la bactériorhodopsine solubilisée.

- (F1) : caroténoïdes
- (F2) : bactériorhodopsine purifiée
- (F3) : bactériorhodopsine altérée

par le détergent ou par des interactions hydrophobes très fortes avec le gel (ou bien les deux) faisant apparaître une pseudométa-bR à 405 nm à l'obscurité, laquelle subit une dénaturation progressive remarquée par l'augmentation successive de la bande d'absorption à 387 nm.

### 3.3.2 Analyse des fractions par chromatographie sur couche mince (CCM)

Afin de déterminer si la bR recueillie est délipidée, une analyse des différentes fractions d'élution a été effectuée par chromatographie sur couche mince (CCM). La séparation complète des lipides de la membrane pourpre peut seulement être obtenue par une CCM en deux dimensions (Kushwaha et al. 1975a). Avec le mélange de solvants que nous avons utilisé, les lipides polaires des membranes pourpres se séparent en quatre groupes de bandes comme l'indique la figure 13 par le tracé A. Des taches étendues peuvent être observées dans les régions suivantes du chromatogramme: 0,5-1,0 cm, 2,0-3,5 cm, 4,0-5,0 cm et 7,0-8,0 cm. Toutes ces bandes peuvent aussi être retrouvées dans le chromatogramme B, lequel correspond aux lipides présents dans le premier 200 ml du patron d'élution de la figure 11. Les lipides associés à la bR sont analysés dans le tracé C de la figure 13. Lorsque les lipides extraits d'un échantillon de bR élue de la chromatographie hydrophobe sont étudiés dans le même mélange de solvants, il apparaît deux bandes à 2,8 et 9,0 cm respective-

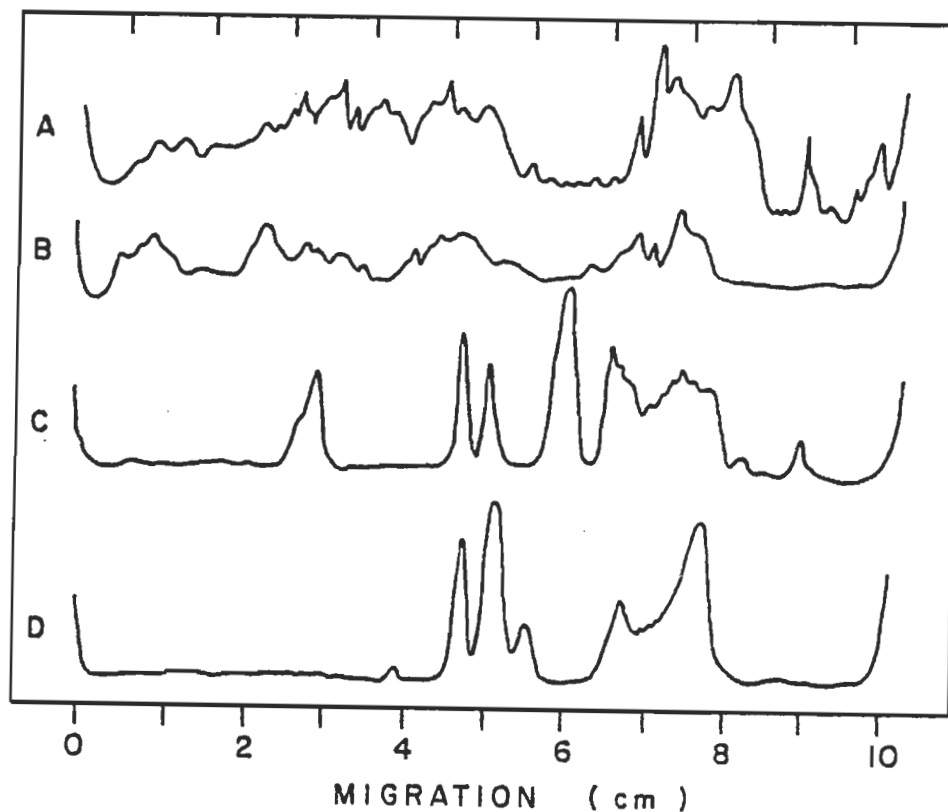


Figure 13 : Chromatogramme résultant de la séparation sur couche mince de Silica gel G (25 $\mu$ ), par un mélange de chloroforme: méthanol: eau (65:35:4 v/v), des échantillons suivants:

- a) Lipides polaires extraits des membranes pourpres
- b) Lipides polaires extraits des fractions recueillies durant le lavage de la colonne de Phényl Sépharose avec 0,1% de lauryl sucrose (voir figure 11)
- c) Lipides polaires extraits des fractions recueillies de la colonne de Phényl Sépharose, contenant la bactériorhodopsine
- d) Lauryl sucrose seulement

Les "taches" ont été révélées avec de l'acide sulfurique contenant 0,6% de  $K_2Cr_2O_7$  et analysée avec un densitomètre à balayage. Les lipides ont été extraits tel que décrit à la section 2.3.2.3.

ment. Ces bandes ne correspondent vraisemblablement pas au détergent, dont le chromatogramme est montré dans le tracé D de la même figure, et ne peuvent donc être attribuées qu'à des lipides étant toujours associés avec la bR. Ces résultats démontrent que la chromatographie hydrophobe peut séparer la bR d'une bonne quantité de ses lipides membranaires mais nous n'avons pas réussi à éliminer complètement les lipides résiduels, même par de multiples étapes chromatographiques, en utilisant uniquement le lauryl sucrose comme détergent. C'est la raison pour laquelle nous avons dès lors utilisé ce détergent surtout à cause de son efficacité comme agent stabilisant plutôt que comme agent solubilisant.

### 3.3.3 Délipidation par la méthode de Huang et coll.

D'autres chercheurs ont parallèlement effectué des expériences dans le but de purifier la bR. Ainsi, Huang et coll. (1980) ont mis au point une technique chromatographique permettant d'enlever 99% des lipides endogènes, à en juger par le radio-dosage des lipides. La méthode consiste à solubiliser la MP dans le Triton X-100 pour ensuite la déposer sur le tamis moléculaire sur lequel la purification s'effectue. L'éluution de la bR est réalisée avec une solution d'un autre détergent: le deoxycholate (DOC). Le choix du Triton X-100 pour la solubilisation est dû au fait que ce détergent possède la propriété de monomériser efficacement en un temps convenable la MP et l'échange de détergent pour le DOC s'explique par la

stabilité relativement meilleure de la bR dans ce second détergent et surtout par la facilité avec laquelle il peut être dialysé. La bR résultant de cette filtration sur gel d'agarose est ainsi solubilisée dans le DOC.

#### 3.3.4 Echange de détergent

Quoique le DOC offre une stabilité relativement bonne, nous désirons tout de même travailler avec le lauryl sucrose, un détergent très doux, capable de solubiliser la protéine et dans lequel la bR reste apparemment intacte et fonctionnelle très longtemps. Dans ce but, nous avons ajouté à la méthode de délipidation du Huang et al. jusqu'ici incontestée, une autre technique nous permettant d'échanger les détergents utilisés lorsqu'on a des préparations de bR. Cette méthode a été décrite en 2.3.2 et elle consiste à substituer le DOC par le lauryl sucrose par chromatographie hydrophobe sur gel de Phényl Sépharose, puisque la bR interagit avec ce support hydrophobe. La bR purifiée est par la suite concentrée par ultrafiltration sur filtre Amicon.

#### 3.3.5 Résultats de la délipidation

On obtient ainsi des échantillons de bR dans le lauryl sucrose ne contenant pas de quantité détectable de lipides membranaires (Huang et coll.1980). Elle est monomérique si on en juge par l'absence des bandes caractéristiques de la forme trimérique native

du spectre de dichroïsme circulaire. De plus, elle ne montre pas de dégradation sur une période de quelques mois lorsqu'elle est gardée à 4°C sous des conditions de pH modéré.

La figure 14 nous montre un spectre d'absorption de la bR délipidée (à pH 6). Ce spectre est caractérisé par une bande d'absorption centrée à 540 nm, et la propriété d'adaptation à la lumière dans cette forme de bR est toujours existante.

### 3.3.6 Discussion

Alors que la bR solubilisée dans le L-1690 a un maximum d'absorption à 550 nm, la bR purifiée dans ce même détergent subit encore un léger déplacement pour montrer une bande d'absorption vers 540 nm. Cette valeur est très proche de celle reportée par Huang et coll. (1980) pour la bR purifiée dans le Triton X-100 (538 nm). Selon Lam et Packer (1983), ce résultat peut être interprété comme une perturbation avancée des interactions chromophore-protéine.

Cependant, considérant le fait que parmi les détergents utilisés (Triton X-100, Octylglucoside et lauryl sucrose) (Huang et nous-mêmes) seulement le Triton X-100 permet de délipider complètement la bR, nous pouvons conclure que les interactions natives lipides-protéines ne sont pas facilement détruites avec la plupart des détergents et que ces interactions sont essentielles au maintien de la structure native

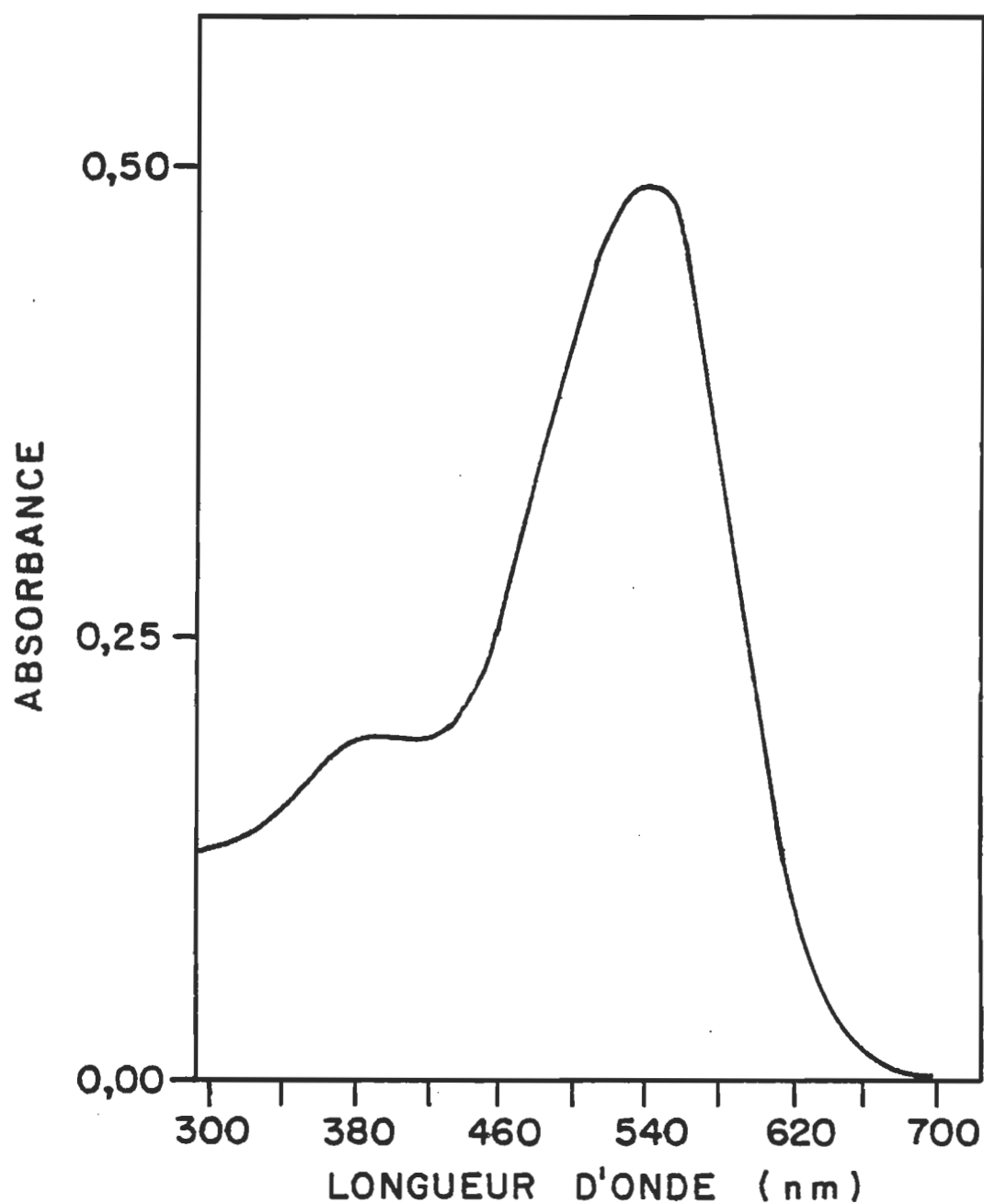


Figure 14 : Spectre d'absorption de la bactériorhodopsine après la délipidation et la chromatographie sur gel de Phényl Sépharose CL-4B;

$\lambda_{\text{max}} = 540 \text{ nm}$ , pH = 6.



de la bR. En effet, une forte relation semble exister entre le déplacement hypsochrome de la bande d'absorption de la bR et sa structure dans le voisinage du chromophore. Cette affirmation est appuyée par le fait que l'émission de fluorescence des résidus de tryptophane est plus ou moins atténuée par transfert d'énergie vers le rétinol dépendant de l'intégrité de la structure native de la bR (Honig et Ebrey 1974, Kalisky et al. 1981).

Nous n'avons pas effectué de telles mesures de fluorescence mais nous croyons toutefois que ce grand déplacement vers les régions bleues du spectre d'absorption de la bR purifiée par Huang et nous-mêmes représente la structure de la bR la plus altérée qui soit toujours stable. Les traitements avec des détergents encore plus puissants induisent un trop grand changement et il en résulte une dénaturation rapide de la bR.

### 3.4 Propriétés spectroscopiques de la bactériorhodopsine délipidée

#### 3.4.1 Effet du pH

Contrairement aux membranes pourpres solubilisées qui ont leur principale bande d'absorption toujours située dans la région de 550 nm, la bactériorhodopsine délipidée possède une caractéristique qui, à notre connaissance, n'a jamais été rapportée pour aucun complexe rétinol-protéine, à savoir un effet

très marqué du pH sur la position de la bande d'absorption. A pH neutre, la bR délipidée montre toujours une large bande d'absorption non-homogène dans la région 500 nm. En fait, le  $\lambda_{\text{max}}$  dépend du pH comme nous le montre la figure 15.

Lorsqu'on fait varier le pH de 5 à 10, la bR purifiée apparaît sous deux formes spectrales distinctes: une forme alcaline dont le maximum d'absorption est centrée autour de 480 nm et une bR acide ayant un  $\lambda_{\text{max}}$  à 540 nm. Entre les pH 6 et 7, la bande d'absorption est très mal définie et elle ressemble à la superposition d'au moins deux bandes (ligne pointillée) tandis qu'à des valeurs de pH supérieures à 7, le maximum d'absorption est déplacé graduellement vers les plus basses longueurs d'onde pour se stabiliser à 480 nm. A pH inférieur à 6, le  $\lambda_{\text{max}}$  se déplace vers 540 nm. L'apparition de ces deux formes spectrales, ci-après désignées  $\text{bR}_{480}$  et  $\text{bR}_{540}$ , est montrée dans la figure 16. On y voit la variation du  $\lambda_{\text{max}}$  de la bande d'absorption en fonction du pH par la courbe en trait plein. Il est évident, par cette courbe, que nous n'avons pas une relation linéaire entre le pH et la longueur d'onde d'absorption. Entre les pH 9 et 5, il y a conversion de  $\text{bR}_{480}$  en  $\text{bR}_{540}$  et à pH inférieur à 5,  $\text{bR}_{540}$  se convertit en une autre espèce dont le maximum d'absorption subit un déplacement vers les plus longues longueur d'onde, c'est-à-dire vers 590 nm, causé par un chromophore différent.

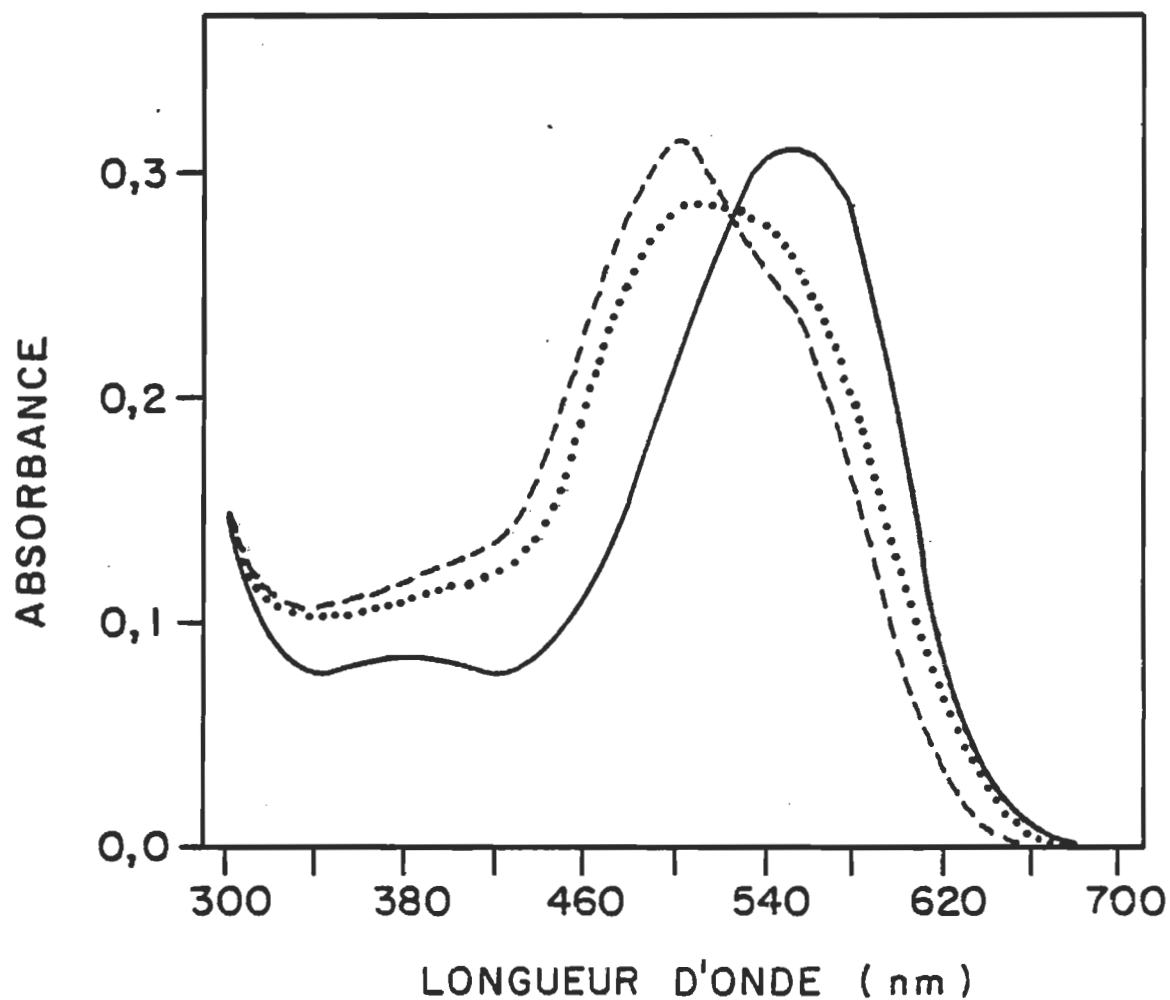


Figure 15 : Effet du pH sur le spectre de la bactériorhodopsine purifiée.

Les spectres ont été enregistrés à 22°C et la bactériorhodopsine est contenue dans une solution à 0,2% (p/v) de lauryl sucrose (...) dans un tampon phosphate 50 mM (pH = 7,0); après alcalinisation à pH = 8 par addition d'une petite quantité de NaOH 0,1 N (---) et après acidification à pH = 6,0 par l'addition de HCl 0,1 N (—).

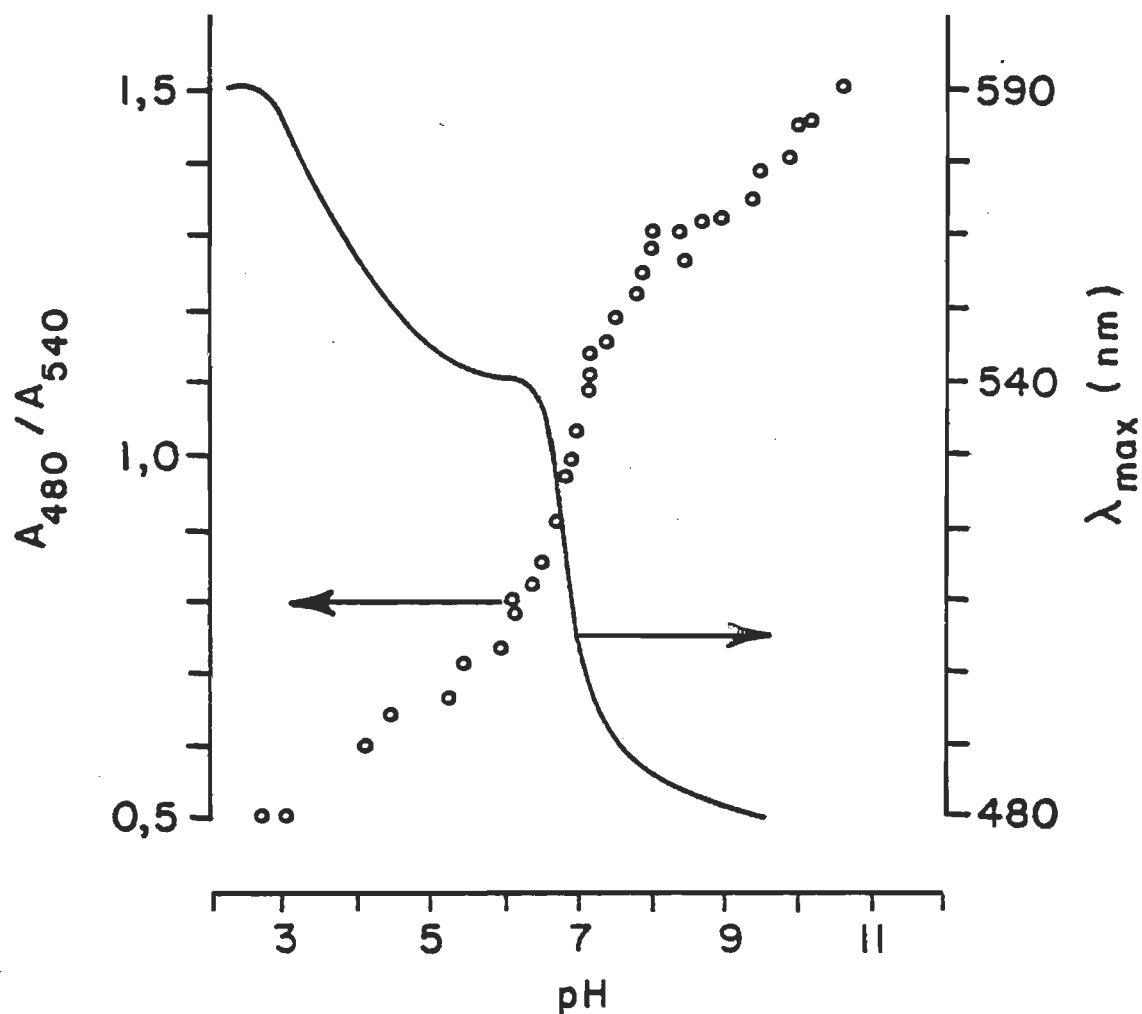


Figure 16 : Rapport des absorbances à 480 et 540 nm (O-O-O) et position du  $\lambda_{\max}$  (—) en fonction du pH des échantillons de bactériorhodopsine purifiée, acidifiée ou alcalinisée par l'addition graduelle de 0,1 N de HCl ou NaOH.

Le pKa de l'équilibre acido-basique entre  $bR_{480}$  et  $bR_{540}$  peut aussi être obtenu si nous assumons que le rapport des bandes d'absorption à 480 et 540 nm correspond aux concentrations relatives des  $bR_{480}$  et  $bR_{540}$ . La courbe pointillée de la figure 16 résulte du rapport de  $bR_{480}$  et  $bR_{540}$  ( $bR_{480}/bR_{540}$ ) calculé à partir des spectres d'absorption obtenus à différents pH. Cette courbe de titration montre un pKa apparent pour l'équilibre entre les deux formes de bR de 6,8. Donc à pH neutre, on a un mélange des deux formes absorbant à 480 et 540 nm. De plus, cette réaction de titration est réversible d'une forme spectrale à l'autre à l'obscurité.

#### 3.4.2 Effet de l'hydroxylamine et du borohydrure de sodium

Le blanchiment de la membrane pourpre en présence d'hydroxylamine implique la perte du lien de base de Schiff entre le rétinale et l'apoprotéine et la conversion du rétinale en rétinaleoxime causée par la réaction entre le rétinale et le résidu aminé de l'hydroxylamine. Ce processus résulte en la diminution de la bande d'absorption à 570 nm et l'apparition simultanée de la bande à 366 nm. Il se produit donc des changements significatifs dans l'organisation moléculaire et dans la conformation de la bR dans la MP. D'autre part, le borohydrure de sodium agit en réduisant la double liaison de la base de Schiff. Ces produits réagissent seulement avec l'intermédiaire  $M_{412}$  lorsqu'on illumine les échantillons de bR adaptée à la

lumière. Lors de la formation du méta-intermédiaire dans le photocycle normal de la MP, il y a déprotonation de la base de Schiff, isomérisation du rétinol et des changements concomitants de la conformation de la protéine. C'est alors que le site de liaison de la base de Schiff devient accessible à la réaction avec l'hydroxylamine ou à la réduction par le borohydrure de sodium.

Nous avons donc utilisé ces produits pour déterminer si la bR délipidée a une conformation différente au point où elle pourrait réagir, c'est-à-dire au point où la base de Schiff pourrait être accessible et réagir à l'obscurité avec ces produits. Nous avons ainsi observé que les deux formes spectrales de la bR délipidée et purifiée ne réagissent pas aux traitements soit à l'hydroxylamine ou au borohydrure de sodium à l'obscurité; ce qui est une indication que la protéine n'a pas subi de changements conformationnels aptes à dénaturer la protéine.

### 3.4.3 Discussion

Grâce à la grande stabilité qu'offre le lauryl sucrose pour la bR par rapport aux autres détergents, nous sommes en mesure de pouvoir comparer quelques propriétés de la bR délipidée par rapport à la bR contenue dans sa membrane pourpre native, en particulier l'effet du pH sur les formes spectrales de la bR. A pH acide, Oesterhelt et Stoeckenius (1971) ont observé que le membrane pourpre native change de couleur

pour passer de pourpre à bleue, ce qui correspond à un déplacement du maximum d'absorption de 558 à 605 nm. Le pKa de cette transition spectrale est de 2,9 et il a été proposé récemment que ce phénomène soit causé par la perte de  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$ ; ces ions métalliques étant liés au groupement  $\text{COOH}$  de la chaîne carbonnée terminale de la bR (Chen et al. 1984). En effet, le pK observé pour cette bR acide (2,9) a une valeur cohérente avec la titration des groupements carboxyl (Schuster et al. 1977). De plus, ceci nous donne une indication que dans l'environnement de la protéine, il y a un résidu carboxyl à proximité du site de la liaison du rétinale à l'opsine. Cette même transition a été observée lorsque les MP sont solubilisées dans le lauryl sucrose avec une valeur identique aux membranes pourpres natives en ce qui concerne le pKa apparent de la réaction (Naito et al. 1981).

La formation d'une bR bleue est aussi possible avec la bR purifiée. Le déplacement spectral ayant lieu est de 540 à 590 nm et le pH auquel apparaît l'espèce bathochrome est différent de celui observé dans la MP. Si on considère la partie à l'extrême gauche de la ligne pleine de la figure 16. comme une courbe de titration, le pKa apparent de la transition de la bR purifiée de pourpre à bleue semble être d'environ 4, c'est-à-dire qu'un déplacement de plus de 1 unité de pH s'est produit par rapport à la valeur obtenue dans la MP.

Cependant, l'effet du pH le plus remarquable sur la bR purifiée est le changement soudain de  $bR_{540}$  à  $bR_{480}$  se produisant entre les pH 6 et 8. Dans cette étendue de pH, un tel changement spectral n'a jamais été cité dans les membranes pourpres solubilisées et nous n'avons pas non plus observé ce phénomène dans les préparations de bR qui ne sont pas complètement délipidées. Récemment, Druckmann et coll. (1982) ont reporté l'existence d'un équilibre acido-basique entre deux formes spectrales de bR dans la membrane pourpre. Dans ce cas, la bR native adaptée à l'obscurité ( $bR_{560}$ ) pouvait être titrée réversiblement en une bR ayant un déplacement hypsochrome de son spectre d'absorption d'environ 100 nm;  $bR_{460}$  désignée d'après le spectre de différence entre les deux formes. Cette transition montre un pKa apparent de 13,3. De plus, si on s'intéresse au groupement directement impliqué dans la titration entre les deux formes de bR, une comparaison entre les spectres de résonance Raman de ces deux formes spectrales indique que la formation de  $bR_{460}$  correspond à la déprotonation du lien de base de Schiff entre le rétinale et la bactéριοopsine. Tandis que le chromophore protoné de la bR montre une bande d'élongation  $C = N$  à  $1644\text{ cm}^{-1}$ , le pigment ayant une base de Schiff déprotonée, comme le méta-intermédiaire  $M_{412}$ , a une vibration  $C = N$  à  $1621\text{ cm}^{-1}$  et la bande à  $1644\text{ cm}^{-1}$  est absente. D'après ces données, la  $bR_{460}$  observée par Druckmann est déprotonée puisqu'il apparaît une bande caractéristique au lien  $C = N$  à  $1621\text{ cm}^{-1}$ . Une interprétation



similaire pourrait être suggérée par nos résultats expérimentaux mais nous n'avons présentement aucune évidence expérimentale directe nous permettant d'identifier la nature réelle du groupement titrable en cause dans la bR purifiée qui possède un pKa de 6,8.

Cependant, dans le but d'apporter une preuve, toute indirecte fut-elle, de l'identification de  $bR_{480}$  au chromophore déprotoné identifié par Druckmann et coll., nous avons étudié l'effet du pH sur l'absorption de la bactériorhodopsine dans la membrane pourpre solubilisée dans le lauryl sucrose. Les résultats sont montrés dans la figure 17 et comparés avec ceux de Druckmann et coll.. On peut voir que dans la bactériorhodopsine solubilisée mais non délipidée,  $bR_{480}$  n'apparaît qu'à des pH supérieurs à 12. Le pKa apparent de l'équilibre entre les deux formes spectrales est de 12,5, c'est-à-dire qu'il y a une différence de 1 unité de pH par rapport à la courbe de titration de la base de Schiff du rétinol dans la membrane pourpre (pKa = 13,3). L'équilibre acido-basique entre  $bR_{540}$  et  $bR_{480}$  existe donc à un intervalle de pH considérablement plus alcalin dans la membrane pourpre native ou solubilisée, comparativement au même équilibre dans la bR délipidée. On s'aperçoit donc que dans la bR purifiée, la position de la bande d'absorption est contrôlée par un groupement qui est accessible à la titration acido-basique lorsque

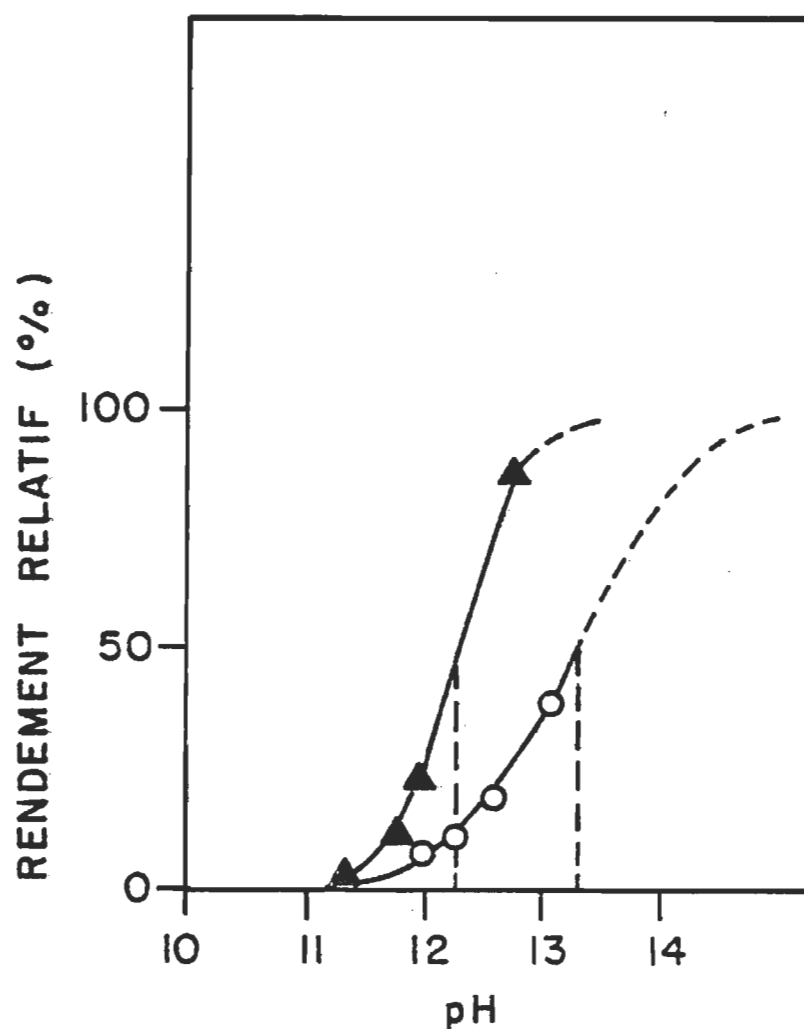


Figure 17 : Effet de l'alcalinisation de la bactériorhodopsine solubilisée dans 2% de L-1690 (▲-▲-▲) par comparaison à la membrane pourpre native (○-○-○). Cette dernière courbe de titration a été calculée par Druckmann et al. (1982) et montre un  $pK_a$  apparent de 13,3. La courbe de titration de la bactériorhodopsine solubilisée a été normalisée à celle de Druckmann et al.; elle montre un  $pK_a$  apparent de 12,5. L'ordonnée (rendement relatif) correspond à la concentration relative de  $bR_{480}$ .

les lipides sont absents. Ce groupement semble être beaucoup plus difficile à atteindre dans les MP natives ou solubilisées, c'est-à-dire lorsque les lipides sont présents dans l'environnement de la protéine puisqu'il faut des valeurs de pH autour de 13 pour réaliser la transition entre les deux formes spectrales. On imagine mal comment une protéine peut garder toute son intégrité structurale à une telle valeur de pH. Ainsi, le site de la titration ayant lieu à un pH près de la neutralité en ce qui concerne la bR délipidée pourrait être protégé non par la matrice de la bactéριοopsine comme le prétend Ehrenberg et coll. (1980) mais bien par les lipides membranaires, ce qui obligerait à détruire, du moins partiellement, la protéine pour pouvoir avoir accès au site de titration et cette dénaturation de l'opsine ne se produit qu'à pH beaucoup plus alcalin comme celui auquel Druckmann et Ehrenberg ont travaillé. Ainsi, ce pH = 13 ne correspondrait pas réellement à la titration entre les deux formes mais à la destruction de la bactéριοopsine ou d'une interaction lipide-protéine masquant le groupement où la titration s'effectue. Le fait que lorsque la bR est délipidée, la transition ait lieu à pH = 6,8 appuie cette hypothèse car les lipides étant absents, le site de titration est immédiatement atteint et l'équilibre entre les deux formes peut être visible. Si ce n'était que la matrice de la bactéριοopsine qui protégeait le site de la titration, on n'aurait pas accès au groupement titrable même

lorsque la bR est délipidée, et la valeur du pK observée serait aux alentours de 13 comme pour les MP natives ou solubilisées.

L'apparition de  $bR_{480}$  à des valeurs de pH près de la neutralité peut s'expliquer par deux sortes de processus: en premier lieu, il pourrait s'agir de la titration d'un groupement dans l'environnement du chromophore, ou deuxièmement, ce pourrait être le chromophore lui-même qui soit titré. Si on se réfère au modèle de charge ponctuelle externe généralement accepté pour la bR (Nakanishi et al. 1980), le  $\lambda_{\max}$  de l'absorption du chromophore peut s'expliquer considérant que la base de Schiff entre le rétinale et la bactérioropsine soit protonée, que la charge positive de l'azote soit stabilisée par un contre-ion négatif situé à environ 3Å de l'atome d'azote et qu'une charge négative additionnelle soit située à environ 3,5 Å de l'anneau  $\beta$ -ionone du rétinale; ces deux charges négatives responsables du déplacement spectral étant fournies par le squelette polypeptidique de la bactérioropsine (voir figure 18). On peut donc facilement concevoir que même de petits changements conformationnels des résidus peptidiques aux alentours du rétinale peuvent induire un déplacement spectral dans la bR.

Tandis que de tels changements conformationnels peuvent facilement expliquer le déplacement hypsochrome observé lors

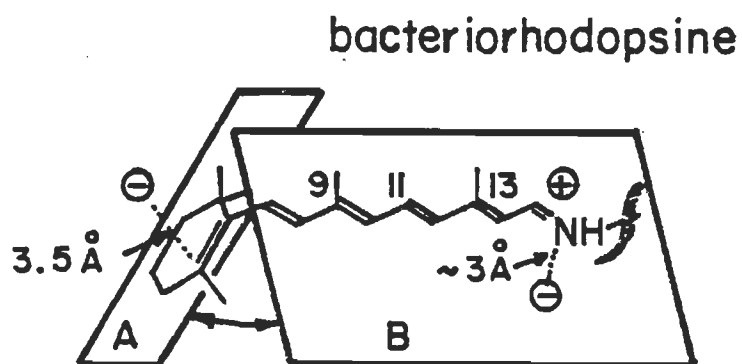


Figure 18 : Modèle de charge ponctuelle externe proposé par Nakanishi pour la bactériorhodopsine. Il y a un angle de  $45^\circ$  entre l'anneau  $\beta$ -ionone et la chaîne du polyène. Deux charges négatives sont situées à  $3 \text{ \AA}$  de l'azote protoné et à  $3.5 \text{ \AA}$  du carbone 5 de l'anneau respectivement.

de la solubilisation et la purification de la bR, ils peuvent difficilement expliquer le grand déplacement hypsochrome observé lors de la titration de la bR purifiée entre les pH 6 et 8. En effet, le déplacement spectral ayant lieu quand  $bR_{480}$  est formé à partir de  $bR_{540}$  a une valeur de  $2\,315\text{ cm}^{-1}$ , ce qui correspond environ à la moitié du déplacement total observé lorsqu'on lie le rétinale à la bactériorhodopsine ( $4\,870\text{ cm}^{-1}$ ) (Nakanishi et al. 1980). Si on se fie au modèle de charge ponctuelle externe, cette valeur de  $2\,315\text{ cm}^{-1}$  pourrait correspondre à la neutralisation d'une des deux charges négatives. Cependant, on peut difficilement concevoir qu'un acide aminé chargé négativement puisse perdre sa charge lors de l'alcalinisation.

On peut aussi considérer la possibilité que  $bR_{480}$  soit un chromophore déprotoné si on se base sur les travaux de Druckmann et coll. (1982) qui ont trouvé que la bR ayant une base de Schiff déprotonée montre un maximum d'absorption près de 480 nm. Ils ont obtenu un déplacement spectral de  $2\,900\text{ cm}^{-1}$ ; ce qui est près de la valeur que nous avons observée. Cependant, alors que le pKa de l'équilibre dans les expériences de Druckmann est de 13,3, nous avons observé, pour notre part, un pKa de 6,8. Ces deux valeurs sont très éloignées mais nous croyons que 13,3 est un pH très élevé pour la déprotonation de la base de Schiff, particulièrement si nous considérons que le pKa d'une base de Schiff d'un chromophore

modèle en solution est autour de 6,5 (Favrot et al. 1978).  
 Considérant enfin qu'en présence des lipides endogènes, l'équilibre entre  $bR_{480}$  et  $bR_{540}$  voit son pKa déplacé de 6,8 à une valeur voisine du pKa observé pour la déprotonation de la base de Schiff par Druckmann et coll., nous suggérons d'identifier  $bR_{480}$  à un chromophore dont la base de Schiff est déprotonée.

### 3.5 Caractérisation des intermédiaires du photocycle de la bactériorhodopsine purifiée

Afin de mieux caractériser le chromophore déprotoné,  $bR_{480}$ , par comparaison avec  $bR_{540}$ , nous avons examiné quelques-unes de leurs propriétés photochimiques, en particulier leurs méta et batho-intermédiaires. Comme pour la rhodopsine visuelle, les photo-intermédiaires de la bR peuvent être trappés si le pigment est irradié à une température inférieure à celle correspondant à la stabilité thermique d'un photo-intermédiaire donné.

#### 3.5.1 Comparaison des méta-produits de la membrane pourpre, la bactériorhodopsine solubilisée et la bactériorhodopsine délipidée

Lorsqu'on irradie la membrane pourpre native ou la membrane pourpre solubilisée dans le L-1690 à 220°K, la  $bR_{570}$  (trimère) ou la  $bR_{555}$  (monomère) se convertissent en un même méta-intermédiaire absorbant à 410 nm (voir figure 19); et cette méta-bR formée peut revenir à sa forme originale soit  $bR_{570}$  ou  $bR_{555}$  en réchauffant l'échantillon à la température initiale.

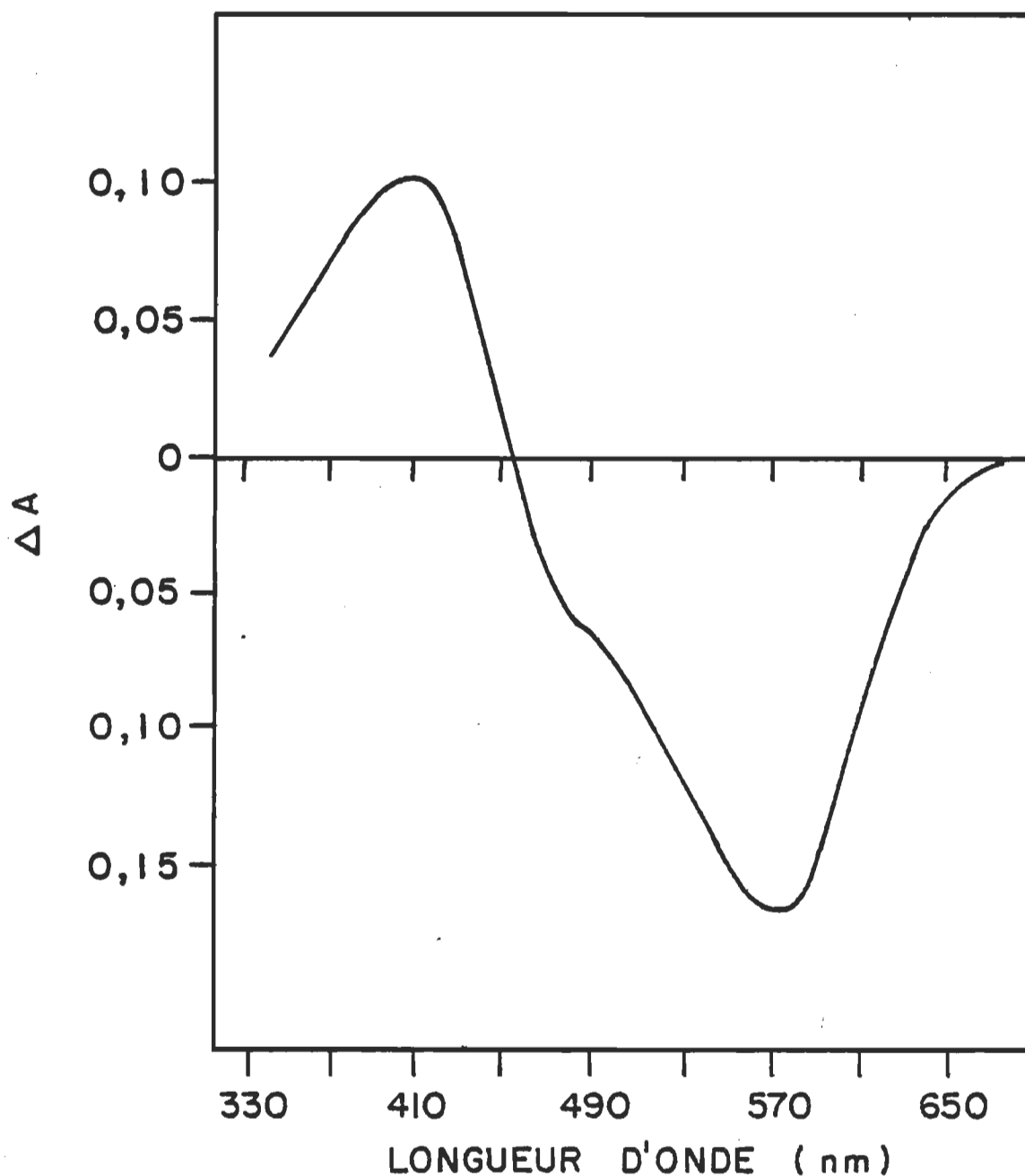


Figure 19 : Formation du méta-intermédiaire de la membrane pourpre solubilisée. Spectre de différence enregistré après irradiation de la membrane pourpre solubilisée dans 2% (p/v) de lauryl sucrose et 60% (v/v) de glycérol dans un tampon phosphate 50 mM (pH = 7.0) à 220° K. Le spectre est enregistré après 5 minutes d'irradiation au travers d'un filtre interférentiel Baird Atomic à 550 nm (bande passante: 50 nm). L'intensité lumineuse à la position de l'échantillon 17 Wm<sup>-2</sup>.



Dans la bR purifiée, nous avons cité deux formes spectrales distinctes. Par irradiation de la forme protonée  $bR_{540}$  et/ou de la forme déprotonée  $bR_{480}$  à  $220^{\circ}\text{K}$ , on obtient une même méta-bR ayant un maximum d'absorption centré autour de 385 nm comparativement à la valeur de 410 nm pour le méta-intermédiaire de la MP native ou solubilisée dans le L-1690. La figure 20 montre le spectre de différence enregistré après 5 minutes d'irradiation de la bR purifiée adaptée à la lumière à  $220^{\circ}\text{K}$ , température où la méta-bR est stable. A pH 7,1 où les deux formes de bR (480 et 540) coexistent, le spectre de différence (ligne pleine) montre clairement deux minima (un minimum à 480 et un épaulement à 540 nm) nous indiquant la disparition de  $bR_{480}$  et  $bR_{540}$ , et un maximum à 385 nm dû à l'accumulation de la méta-bR. Dans une expérience supplémentaire,  $bR_{540}$  et  $bR_{480}$  ont été sélectivement irradiées au moyen d'un filtre interférentiel ayant une étroite bande passante à 450 et 550 nm. Ces deux types d'irradiation font apparaître une même méta-bR à 385 nm avec la disparition simultanée de principalement  $bR_{480}$  ou  $bR_{540}$  dépendant de la longueur d'onde de l'irradiation. La méta- $bR_{385}$  peut ainsi être directement formée à partir de  $bR_{480}$  ou  $bR_{540}$ . La ligne pointillée de la figure 20 nous montre l'exemple de la bR excitée au moyen du filtre à 450 nm; ce qui résulte en la formation ou l'apparition d'un maximum à 385 nm. En revenant à la température initiale, on retrouve le mélange original de  $bR_{540}$  et/ou  $bR_{480}$  dépendant du pH des échantillons.

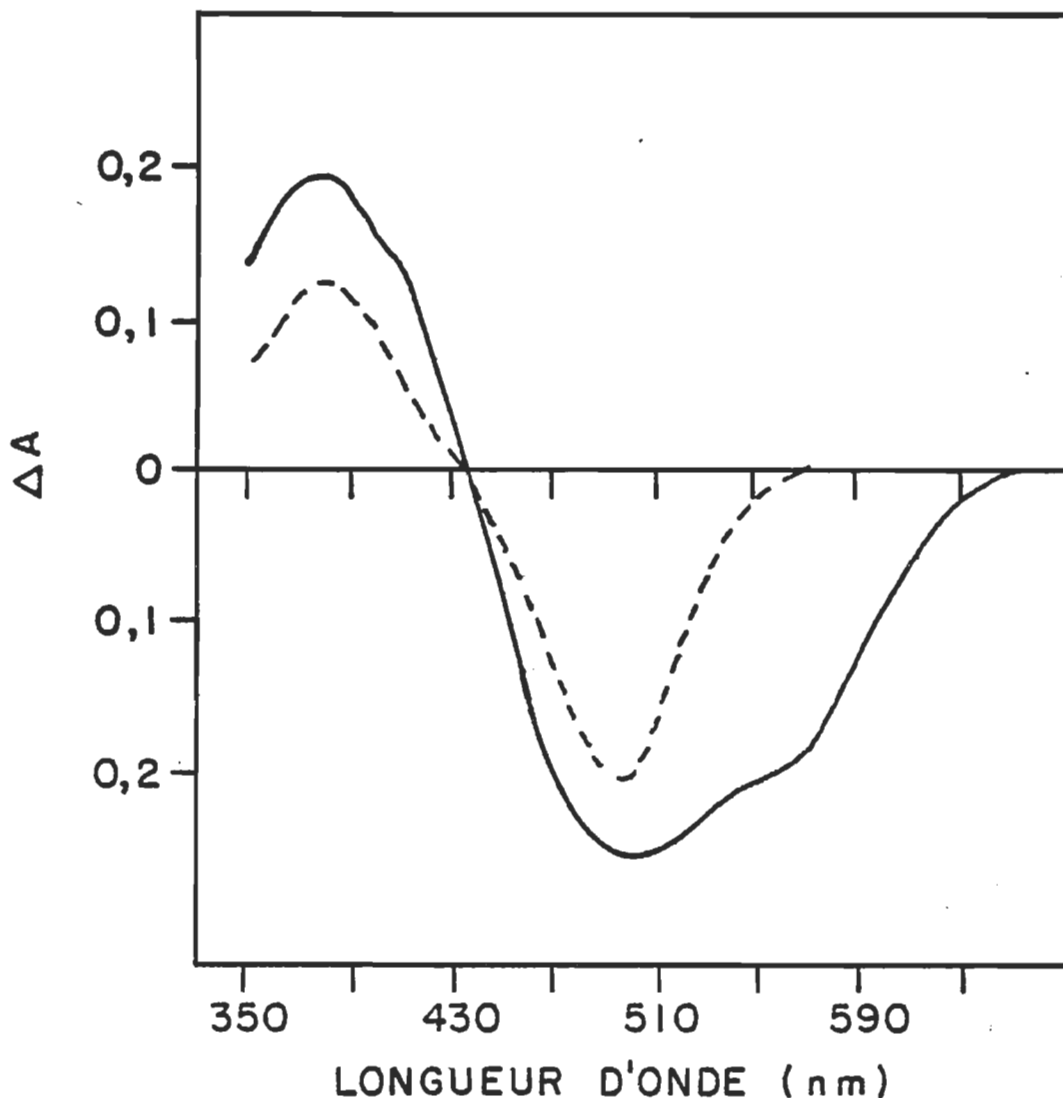


Figure 20 : Formation du méta-intermédiaire de la bactériorhodopsine purifiée. Spectre de différence enregistré après irradiation de la bactériorhodopsine purifiée dans 0,2% (p/v) de lauryl sucrose et 60% v/v de glycérol dans un tampon phosphate 50 mM (pH = 7.0) à 220° K. L'absorbance de l'échantillon à 500 nm était de 0,5.

(—) Spectre enregistré après 5 minutes d'irradiation au travers d'un filtre passe-bande Rolyn à 498 nm. L'intensité lumineuse à la position de l'échantillon:  $182 \text{ Wm}^{-2}$ .

(---) Spectre enregistré après 5 minutes d'irradiation au travers d'un filtre interférentiel Baird Atomic à 450 nm (largeur de bande 50 nm). L'intensité lumineuse à la position de l'échantillon:  $31 \text{ Wm}^{-2}$ .

### 3.5.2 Formation des batho-intermédiaires

Lorsque l'irradiation est effectuée à la température de l'azote liquide, le premier photo-~~inter~~médiaire, la batho-bR, ne peut pas se transformer thermiquement en son intermédiaire successif donc il peut être observé. Dans l'étendue de pH où les deux formes de bR coexistent, un mélange de deux différents batho-intermédiaires peut être formé si les échantillons ne sont pas irradiés sélectivement. Cependant, si on excite sélectivement  $bR_{480}$  ou  $bR_{540}$ , des batho-intermédiaires spécifiques peuvent être observés pour chacune des espèces de bR purifiée. La figure 21 montre les spectres de différence enregistrés après irradiation des échantillons à 77°K. A pH 7, l'excitation à 550 nm mène à la formation d'une batho-bR absorbant à 605 nm (ligne pleine). Ce  $\lambda_{\max}$  est très près de celui qu'on observe pour la batho-bR dans la membrane pourpre (610 nm). Lorsqu'on irradie les échantillons à pH 9, où l'espèce  $bR_{480}$  prédomine, l'excitation à 450 nm mène à la formation d'un intermédiaire bathochrome ayant un maximum d'absorption à 535 nm (ligne pointillée). On a donc la disparition de  $bR_{540}$  et  $bR_{480}$  pour donner lieu à la formation de batho- $bR_{605}$  et batho- $bR_{535}$  respectivement. Ces deux formes de bR et leur batho-produit ne semblent pas photoconvertibles entre eux, du moins à 77°K. Ainsi, les deux batho-intermédiaires se reconvertissent à leur pigment initial respectif par irradiation des échantillons à 77°K. Nous n'avons jamais observé la photoformation de  $bR_{540}$  par ir-

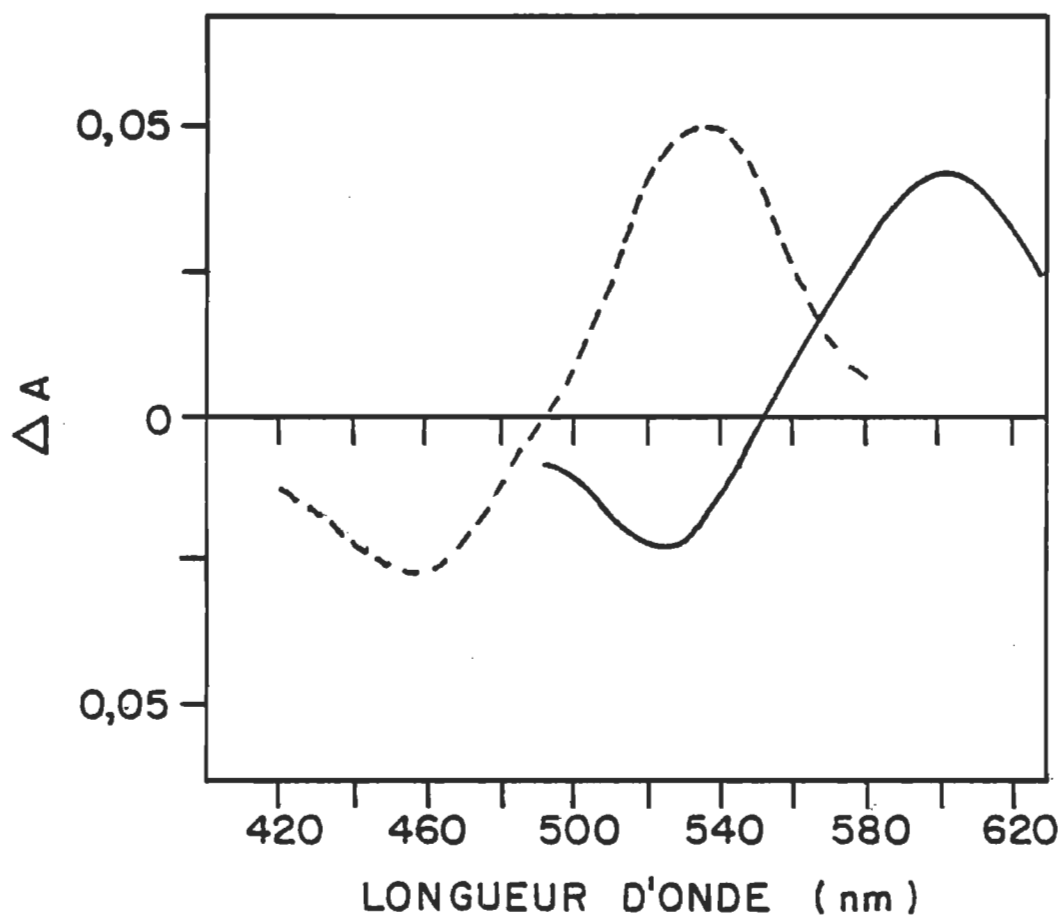


Figure 21: Formation des batho-intermédiaires de la bactériorhodopsine purifiée. Spectre de différence enregistré après 5 minutes d'irradiation de la bactériorhodopsine purifiée à 77° K.

(—) L'échantillon (0,2 A à 500 nm) est contenu dans 0,2% (p/v) de lauryl sucrose et 60% de glycérol dans un tampon phosphate 50 mM (pH = 7,0) et irradié au travers d'un filtre interférentiel Baird Atomic à 550 nm (bande passante: 50 nm). L'intensité lumineuse à la position de l'échantillon: 17 Wm<sup>-2</sup>.

(---) L'échantillon (0,5 A à 480 nm) est contenu dans 0,2% (p/v) de lauryl sucrose et 60% de glycérol dans un tampon carbonate 50 mM (pH = 9,0) et irradié au travers d'un filtre interférentiel Baird Atomic à 450 nm (bande passante: 50 nm). L'intensité lumineuse à la position de l'échantillon: 31 Wm<sup>-2</sup>.

radiation de la batho-bR<sub>535</sub>. Il n'a pas été possible non plus d'observer autre chose que la formation de bR<sub>540</sub> par irradiation de la batho-bR<sub>605</sub>.

### 3.5.3 Discussion

Lorsque nous avons varié le pH de la bR purifiée nous avons remarqué que l'alcalinisation produisait un déplacement de la bande d'absorption de 540 à 480 nm, ce qui est un déplacement spectral prévisible pour la déprotonation du chromophore. La photochimie de bR<sub>540</sub> et bR<sub>480</sub> favorise cette interprétation. Le comportement photochimique des deux espèces de bR peut être représenté par le schéma de la figure 22.

La bR et son premier photoproduit (batho-bR) ont des bases de Schiff protonées (Lewis et al. 1974, Marcus et Lewis 1978, Aton et al. 1977, Aton et al. 1979, Turner et al. 1979). Une fois adaptée à la lumière, bR<sub>540</sub> et bR<sub>480</sub> forment différents batho-intermédiaires absorbant près de 605 et 535 nm respectivement. Nous pouvons remarquer que l'adaptation à la lumière et la formation du premier intermédiaire bathochrome dans la bR native (bR<sub>560</sub>), dans la bR<sub>540</sub> et la bR<sub>480</sub> induisent tous des déplacements spectraux semblables soient 1938, 1983 et 2 141 cm<sup>-1</sup> respectivement, indiquant que des changements presque identiques se produisent dans les trois espèces au niveau de l'iso-

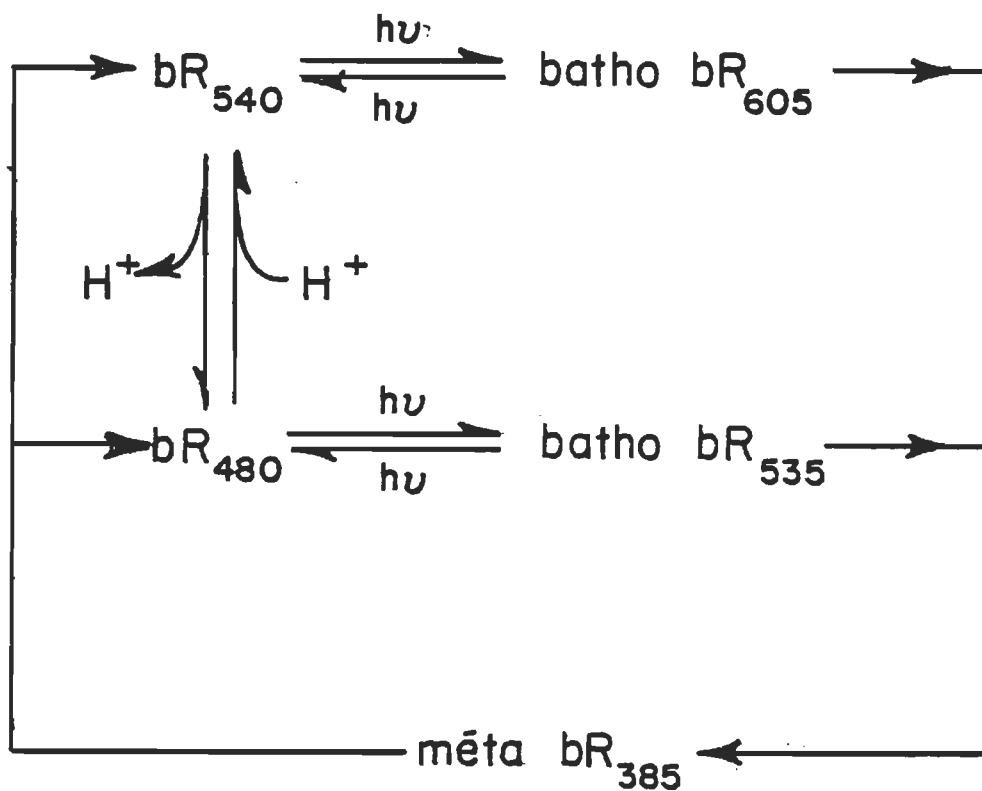


Figure 22 : Schéma de la photochimie de la bactériorhodopsine purifiée dans 0,2% (p/v) de lauryl sucrose. Les réactions lumineuses sont identifiées par  $h\nu$

mérisation du rétinale et du réarrangement des interactions rétinale-protéine (Lewis 1982).

Lorsqu'on réchauffe l'échantillon, les deux différents batho-intermédiaires (batho-bR<sub>605</sub> et batho-bR<sub>535</sub>) forment la même méta-bactériorhodopsine (méta-bR<sub>385</sub>). La méta-bR a une base de Schiff déprotonée (Lewis et al. 1974, Aton et al. 1977). Nous pouvons donc conclure que la différence entre bR<sub>540</sub> et bR<sub>480</sub> est l'état de protonation du chromophore puisqu'ils partagent un même méta-intermédiaire déprotoné.

### 3.6 Discussion générale

Nous avons vu que la plupart des détergents qui solubilisent bien la MP, occasionnent aussi la dénaturation de la bR. De tous les détergents que nous avons expérimentés, le lauryl sucrose s'est avéré être le meilleur agent stabilisant pour la bR. La délipidation de la bR s'est donc effectuée selon une méthode standard utilisant le Triton X-100 comme détergent. Il est à remarquer que seulement le Triton X-100 a réussi à déliper complètement la bR, ce qui nous porte à croire que les interactions natives lipides-protéines ne sont pas facilement détruites avec la plupart des détergents et que ces interactions sont essentielles au maintien de la structure native de la bR. Par la suite, nous procédons à l'échange de détergents pour obtenir des monomères de bR dans le lauryl sucrose. Comme la plupart des détergents non-ioniques, le L-1690 induit un déplacement hypsochrome de la bande d'absorption causé probablement par un changement dans les interactions rétinale-apoprotéine en présence des détergents de telle

sorte que la bR solubilisée montre un maximum d'absorption centré autour de 550 nm, alors que la bR purifiée subissant une perturbation plus avancée des interactions chromophore-protéine a un  $\lambda_{\text{max}}$  autour de 540 nm. Cette bR solubilisée ou délipidée dans le lauryl sucrose conserve sa propriété d'adaptation à la lumière, ce qui est une indication que la protéine possède toujours les propriétés fonctionnelles de la MP native. Des études de photochimie sur ces échantillons de bR dans le lauryl sucrose sont possibles puisque les différents intermédiaires du photocycle de la bR ont été observés soit pour la bR solubilisée ou la bR délipidée.

Une des caractéristiques les plus remarquables de la bR purifiée est sans doute la dépendance de son spectre d'absorption en fonction du pH de l'échantillon. En effet, contrairement à la membrane pourpre native ou solubilisée qui montre une bande d'absorption toujours située à la même longueur d'onde sur le spectre d'absorption indépendamment du pH entre pH 5 et 10, la bR délipidée montre un équilibre entre deux formes spectrales distinctes et interconvertibles à l'obscurité entre pH 6 et 8, soit  $\text{bR}_{480}$  et  $\text{bR}_{540}$ . Ces deux espèces de bR possèdent chacune un bathointermédiaire distinct mais partagent une même méta-bR. Sachant que la méta-bR possède un chromophore déprotoné, ceci nous suggère que la différence entre les deux formes de bR soit dans l'état de protonation de la base de Schiff liant le rétinale à la bactérioropsine.

Si on se fie au modèle de charge ponctuelle externe, le déplacement spectral d'environ 100 nm peut difficilement s'expliquer par de petits changements conformationnels des résidus peptidiques aux alentours du rétinale.



En effet, la valeur du déplacement spectral se produisant est environ la moitié du déplacement total observé lorsqu'on lie le rétinol à la bactériopsine. De plus, on sait qu'il existe une forte relation entre le déplacement hypsochrome de la bande d'absorption de la bR et sa structure dans le voisinage du chromophore. Considérant la valeur du déplacement spectral, on peut penser qu'il s'agit bien de la déprotonation de la base de Schiff.

Ceci est supporté davantage par les travaux de Druckmann et coll. qui ont trouvé l'existence d'une  $bR_{460}$  produite dans la MP native mais à pH 13. Si on s'intéresse au groupement directement impliqué dans la titration, les expériences de résonance Raman effectuées par Druckmann donnent une indication que le chromophore de la  $bR_{460}$  a un lien de base de Schiff déprotoné. Quoique l'équilibre entre les deux formes spectrales observées par Druckmann ( $bR_{560} \xrightleftharpoons{pH\ 13.3} bR_{460}$ ) et nous-mêmes ( $bR_{540} \xrightleftharpoons{pH\ 6.8} bR_{480}$ ) n'existe pas dans les mêmes étendues de pH, ces données nous suggèrent tout de même d'identifier  $bR_{480}$  comme un chromophore déprotoné. Nous croyons que la différence entre les valeurs de pH obtenues pour la titration entre les deux espèces de bR soit causée par une protection du site de titration lorsque les lipides membranaires sont présents dans l'environnement de la bR contrairement à l'hypothèse émise par Ehrenberg et al. qui stipule qu'une protection soit amenée par le squelette polypeptidique de la bactériopsine. De plus, nous croyons qu'une valeur de pK autour de 13 obtenue par Druckmann et Ehrenberg pour l'équilibre entre les deux formes soit justement biaisée par cette protection lipidique du site de la

titration. Une valeur de pK semblable ( $\text{bR}_{550} \xrightleftharpoons{\text{pH } 12} \text{bR}_{480}$ ) a été observée pour la transition entre les deux espèces de bR dans la MP solubilisée. Ainsi, lorsque nous délipidons les échantillons de bR, le pK apparent de l'équilibre se rapproche de la neutralité avec une valeur de 6,8. Cette valeur de pK semble beaucoup plus réaliste si on considère que le pKa d'une base de Schiff d'un chromophore modèle en solution est de 6,5. On pourrait donc supposer qu'une interaction lipide-protéine ait lieu, protégeant le site de la titration donc protégeant le chromophore de telle sorte qu'il faille atteindre des valeurs de pH très alcalin causant la dénaturation de la protéine et rendant le site de la titration accessible pour observer l'équilibre entre les deux formes spectrales de bR.

## BIBLIOGRAPHIE

- Abram, D. et Gibbons, N.E. Turbidity of suspensions and morphology of red halophilic bacteria as influenced by sodium chloride concentration. Can. J. Microbiol., 1960, 6, 535.
- Aton, B., Doukas, A.G., Callender, R.H., Becker, B. et Ebrey, T.G. Resonance Raman studies of the purple membrane. Biochemistry, 1977, 16, 2995-2999.
- Aton, B., Doukas, A.G., Callender, R.H., Becker, B. et Ebrey, T.G. Resonance Raman study of the dark-adapted form of the purple membrane protein. Biochim. Biophys. Acta, 1979, 576, 424-428.
- Bayley, S.T. et Morton, R.A. Recent developments in the molecular biology of extremely halophilic bacteria. CRC Critical reviews in Microbiol., 1978, 151-205.
- Becher, B. et Ebrey, T.G. Evidence for chromophore-chromophore (exciton) interaction in the purple membrane of *Halobacterium halobium*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1976, 69, 1-6.
- Blaurock, A.E. et King, G.I. Asymmetric structure of the purple membrane. Science, 1977, 196, 1101.
- Brown, A.D. et Shorey, C.D. The cell envelopes of two extremely halophilic bacteria. J. Cell. Biol., 1963, 18, 681.

- Callender, R.H. An introduction to visual pigments and purple membranes and their primary processes. In R.R. Alfano (Ed.), Biological Events Probed by Ultrafast Laser Spectroscopy. Toronto: Academic Press, 1982, pp. 239-258.
- Casadio, R., Gutowitz, H., Mowery, P., Taylor, M. et Stoeckenius, W. Light-dark adaptation of bacteriorhodopsin in Triton-treated purple membrane. Biochim. Biophys. Acta, 1980, 590, 13-23.
- Chen, J.G., Chang, C.-H., Govindjee, R. et Ebrey, T. Bacteriorhodopsin's purple color is partially due to divalent cations. Abstr. of the 28th Ann. Meet. of the Biophys. Soc., Biophys. J., 1984, 45, 214a.
- Cho, K.Y., Doy, C.H. et Mercer, E.H. Ultrastructure of the obligate bacterium *Halobacterium halobium*. J. Bacteriol., 1967, 94, 196.
- Danon, A. et Stoeckenius, W. Photophosphorylation in *Halobacterium halobium*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1974, 71, 1234.
- Dencher, N.A. et Heyn, M.P. Formation and properties of bacteriorhodopsin monomers in the non-ionic detergents octyl- $\beta$ -D-glucoside et Triton X-100. FEBS Lett., 1978, 96, 322-326.
- Dencher, N.A. et Wilms, M. Flash photometric experiments on the photochemical cycle of bacteriorhodopsin. Biophys. Struct. Mech., 1975, 1, 259-271.

- DeGrip, W.J. Thermal stability of rhodopsin and opsin in some novel detergents. In L. Packer (Ed.), Methods in Enzymology (vol. 81). Toronto: Academic Press, 1982, 256-265.
- Dratz, E.A. et Hargrave, P.A. The structure of rhodopsin and the rod outer segment disk membrane. Trends in biochemical sciences, 1983, 8 no 4, 128-131.
- Druckmann, S., Ottolenghi, M., Pande, A., Pande, J. et Callender, R.H. Acid-base equilibrium of the Schiff base in bacteriorhodopsin. Biochemistry, 1982, 21, 4953-4959.
- Ehrenberg, B., Lewis, A., Porta, T.K., Nagle, J.F. et Stoeckenius, W. Exchange kinetics of the Schiff base proton in bacteriorhodopsin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1980, 77, 6571-6573.
- FAVROT, J., Sandorfy, C. et Vocelle, D. An infrared study of the basicity of non-aromatic imines: relation to visual pigment. Photochem. Photobiol., 1978, 28, 271-272.
- Gibbons, N.E. Family V. *Halobacteriaceae* Fam. nov. In R.E. Buchanan et N.E. Gibbons (Eds.), Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins, 1974, 269.
- Heyn, M.P., Bauer, J.P. et Dencher, N.A. A natural circular dichroism label to probe the structure of the purple membrane from *Halobacterium halobium* by means of excitation coupling effects. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1975, 67, 897-903.

- Hjberg, B., Lind, C. et Khorana, H.G. Reconstitution of bacteriorhodopsin vesicles with *Halobacterium halobium* lipids. Effects of variations in lipid composition. J. of Biol. Chem., 1982, 257, 1690-1694.
- Honig, B. et Ebrey, T.G. A structure and spectra of the chromophore of visual pigment. Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 1974, 3, 151-177.
- Huang, K.S., Bayley, H. et Khorana, H.G. Delipidation of bacteriorhodopsin and reconstitution with exogenous phospholipid. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1980, 77, 323-327.
- Iwasa, T., Tokunaga, F. et Yoshizawa, T. A new pathway in the photoreaction cycle of trans-bacteriorhodopsin and the absorption spectra of its intermediates. Biophys. Struct. Mech., 1980, 6, 253-270.
- Kalisky, O., Feitelson, J. et Ottolenghi, M. Photochemistry and fluorescence of bacteriorhodopsin excited in its 280-nm absorption band. Biochemistry, 1981, 20, 205-209.
- Kates, M. Ether-linked lipids in extremely halophilic bacteria. In F. Snyder (Ed.), Ether lipids Chemistry and Biology. New York: Academic Press, 1972, p. 351.
- Kates, M. et Kushwaha, S.C. The diphytanyl glycerol ether analogues of phospholipids and glycolipids in membranes of *Halobacterium cutirubrum*. In R. Paoletti, G. Porcellati et G. Jacini (Eds.), Lipids (vol. 1). New York: Raven Press, 1976, p. 267.

- Kates, M., Kushwaha, S.C. et Sprott, G.D. Lipids of purple membrane from extreme halophiles and of methanogenic bacteria. In L. Packer (Ed.), Methods in Enzymology (vol. 88). Toronto: Academic Press, 1982, pp. 98-111.
- Khorana, H.G., Gerber, G.E., Herlihy, W.C., Gray, C.P., Anderegg, R.J., Nihei, K. et Biemann, K. Amino acid sequence of bacteriorhodopsin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1979, 76, 5046-5050.
- Kushner, D.J. Halophilic bacteria. Adv. Appl. Microbiol., 1968, 10, 73.
- Kushner, D.J., Bayley, S.T., Boring, J., Kates, M. et Gibbons, N.E. Morphological and chemical properties of cell envelopes of the extreme halophile *Halobacterium cutirubrum*. Can. J. Microbiol., 1964, 10, 483.
- Kushner, D.J. et Onishi, H. Absence of normal cell wall constituents from the outer layers of *Halobacterium cutirubrum*. Can. J. Biochem., 1968, 46, 997.
- Kushwaha, S.C., Gochnauer, M.B., Kushner, D.J. et Kates, M. Pigments and isoprenoid compounds in extremely and moderately halophilic bacteria. Can. J. Microbiol. 1974, 20, 241.
- Kushwaha, S.C., Kates, M. et Martin, W.G. Characterization and composition of the purple and red membrane from *Halobacterium cutirubrum*. Can. J. Biochem. 1975a, 53, 284.

- Kushwaha, S.C., Kramer, J.K.G. et Kates, M. Isolation and characterization of C<sub>50</sub>-carotenoid pigments and other polar isoprenoids from *Halobacterium cutirubrum*. Biochim. Biophys. Acta, 1975b, 398, 303.
- Lam, E. et Packer, L. Nonionic detergent effects on spectroscopic characteristics and the photocycle of bacteriorhodopsin in purple membranes. Arch. Biochim. Biophys. 1983, 221, 557-564.
- Larsen, H. Halophilism. In I.C. Gunsalas et R.Y. Stanier (Eds.), The bacteria: a Treatise on Structure and Function. New York: Academic Press, 1962, p.297.
- Larsen, H. Biochemical aspects of extreme halophilism. Adv. Microb. Physiol., 1967, 1, 97.
- Lewis, A. Resonance Raman spectroscopy of rhodopsin and bacteriorhodopsin: an overview. In L. Packer (Ed.), Methods in Enzymology (vol. 88). Toronto: Academic Press, 1982, pp.561-617.
- Lewis, A., Spoonhower, J., Bogomolni, R.A., Lozier, R.H. et Stoeckenius W. Tunable laser resonance Raman spectroscopy of bacteriorhodopsin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1974, 71, 4462-4464.
- Litvin, F.F., Balashov, S.P. et Sineshchekov, V.A. Primary photochemical transformations of bacteriorhodopsin in the purple membranes and cells of *Halobacterium halobium* by low-temperature spectrophotometry. Bioorgan. Chem., 1975, 1, 1967.



- Marcus, M.A. et Lewis, A. Resonance Raman spectroscopy of the retinylidene chromophore in bacteriorhodopsin ( $\text{bR}_{570}$ ),  $\text{bR}_{560}$ ,  $\text{M}_{412}$  and other intermediates: structural conclusions based on kinetics, analogues, models and isotopically labeled membranes. Biochemistry, 1978, 17, 4722-4735.
- Naito, T., Kito, Y., Kobayashi, M., Hiraki, K. et Humanaka, T. Retinal-protein interactions in bacteriorhodopsin monomers, dispersed in the detergent L-1690. Biochim. Biophys. Acta, 1981, 637, 457-463.
- Nakanishi, K., Bologh-Nair, V., Arnaboldi, M. et Tsujimoto, K. An external point-charge model for bacteriorhodopsin to account for its purple color. J. Am. Chem. Soc., 1980, 102, 7945-7947.
- Nashima, K., Mitsudo, M. et Kito, Y. Studies on cephalopod rhodopsin. Fatty acid esters of sucrose as effective detergents. Biochim. Biophys. Acta, 1978, 536, 78-87.
- Nashima, K., Kawase, N. et Kito, Y. Effect of phospholipid and detergent on the Schiff base of cephalopod rhodopsin and metarhodopsin. Biochim. Biophys. Acta, 1980, 626, 390-396.
- Oesterhelt, D., Meentzen, M. et Schuhmann, L. Reversible dissociation of the purple complex in bacteriorhodopsin and identification of 13-cis and all-trans-retinal as its chromophores. Eur. J. Biochem, 1973, 40, 453-463.

- Oesterhelt, D. et Stoeckenius, W. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. Nature (London) New Biol., 1971, 233, 149-152.
- Oesterhelt, D. et Stoeckenius, W. Functions of a new photoreceptor membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1973, 70, 2853-2857.
- Ovchinnikov, Y.A. Rhodopsin and bacteriorhodopsin: structure-function relationships. FEBS letters, 1982, 148, 179-191.
- Ovchinnikov, Y.A., Abdulaev, N.G., Feigina, M.Y., Kiselev, A.V. et Lobanov, N.A. The structural basis of the functioning of bacteriorhodopsin: an overview. FEBS Lett., 1979, 100, 219-224.
- Padros, E., Dunack, M. et Sabes, M. Induction of the blue form of bacteriorhodopsin by low concentrations of sodium dodecyl sulfate. Biochim. Biophys. Acta, 1984, 769, 1-7.
- Pettei, M.J., Yudd, A.P., Nakanishi, K., Henselman, R. et Stoeckenius, W. Identification of retinal isomers isolated from bacteriorhodopsin. Biochemistry, 1977, 16, 1955.
- Rabinovitch, E. et Govindjee. Photosynthesis. New York: Wiley, 1969, 273 p.
- Racker, E. et Stoeckenius, W. Reconstitution of purple membrane vesicles catalyzing light-driven proton uptake and adenosine triphosphate formation. J. Biol. Chem., 1974, 249, 662.

- Reynolds, J.A. et Stoeckenius, W. Molecular weight of bacteriorhodopsin solubilized in Triton X-100. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1977, 74, 2803-2804.
- Ryu, E.K. et MacCoss, M. Modification of the Dittmer-Lester reagent for the detection of phospholipid derivatives on thin-layer chromatograms. J. Lipid Res., 1979, 20, 561-563.
- Schuster, P., Wolschann, P. et Tortscanoff, K. Dynamics of proton transfer in solution. In I. Pecht & R. Rigler (Eds.), Chemical Relaxation in Molecular Biology. New York: Springer Verlag, 1977, pp. 107-190
- Sportelli, L. et Martino, G. Photobiological conversion of solar energy. Part I. Bacteriorhodopsin proton pump activity in reconstituted liposomes. Bioelectrochem. and Bioenerg., 1982, 9, 197-206.
- Stoeckenius, W. The purple membrane of salt-loving bacteria. Scientific American, 1976, 234, 38-46.
- Stoeckenius, W. Bacteriorhodopsin. A light-energy transducing molecule from the cell membrane of Halobacteria (Chapter VII). Proceedings of the Robert A. Welch Conferences on Chemical Research XXIV. The Synthesis, Structure and Function of Biochemical Molecules, 1980, pp. 133-147.
- Stoeckenius, W. et Bogomolni, R.A. Bacteriorhodopsin and related pigments of Halobacteria. Ann. Rev. Biochem., 1982, 52, 587-616.

- Stoeckenius, W. et Kunau, W.H. Further characterization of particulate fractions from lysed cell envelopes of *Halobacterium halobium* and isolation of gas vacuole membranes. *J. Cell. Biol.*, 1968, 38, 337.
- Stoeckenius, W. et Lozier, R.H. Light energy conversion in *Halobacterium halobium*. *J. Supramol. Struct.*, 1974, 2, 769.
- Stoeckenius, W. et Rowen, R. A morphological study of *Halobacterium halobium* and its lysis in media of low salt concentration. *J. Cell. Biol.*, 1967, 34, 365.
- Terner, J., Hsieh, C.-L., Burns, A.R. et El-Sayed, M.A. Time-resolved resonance Raman spectroscopy of intermediates of bacteriorhodopsin: the bK<sub>590</sub> intermediate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1979, 76, 3046-3050
- Thomas, D.D. et Stryer, L. Transverse location of the retinal chromophore of bacteriorhodopsin in the purple membrane. *Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, 1980, 39, 1847.
- Tokunaga, F., Iwasa, T. et Yoshizawa, T. Photochemical reaction of bacteriorhodopsin. *FEBS Lett.*, 1976, 72, 33-38.
- Unwin, P.N.T. et Henderson, R. Molecular structure determination by electron microscopy of unstained crystalline specimens. *J. Mol. Biol.*, 1975, 94, 425-440.
- Wallace, B.A. Comparaison of bacteriorhodopsin and rhodopsin molecular structure. In L. Packer (Ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. 88). Toronto: Academic Press, 1982, pp. 447-462.